



P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 9 8 2 9 1 M	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 0 0 1 5	国際出願日 (日.月.年) 0 7 . 0 1 . 9 9	優先日 (日.月.年) 0 8 . 0 1 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 2 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>8</sup> A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>8</sup> A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	K. Duff et al., Nature, vol. 383, p. 710-713 (1996)	1-4, 12-15, 17 18, 33, 36-45 5-11, 16, 19-32, 34, 35
X Y	D. R. Borchelt et al., Neuron, vol. 17, p. 1005-1013 (1996)	1-4, 12-15, 17 18, 33, 36-45 5-11, 16, 19-32, 34, 35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.03.99

国際調査報告の発送日

06.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 6944





C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	M.Citron et al., Nature Medicine, vol.3(1), p.67-72 (1997)	1-4, 12-15, 17
Y		18, 33, 36-50
Y	J.Hardy et al., TINS, vol.20(4), p.154-159 (1997)	5-11, 16, 19-32, 34, 35
Y	K.Kamino et al., Neuroscience Letters, vol.208, p.195-198 (1996)	1-50
Y	山村研一, 「病態生理」, vol.14(12), p.961-966 (1995)	1-50
Y	U. A. K. Betz et al., vol.6(10), p.1307-1316 (1996)	16, 30, 34
		27, 28



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 09 JUL 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 98291M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/00015	国際出願日 (日.月.年) 07.01.99	優先日 (日.月.年) 08.01.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl. <sup>8</sup> A01K 67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15		
出願人(氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☒ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.01.99	国際予備審査報告を作成した日 24.06.99	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 長 井 啓 子 電話番号 03 3581-1101 内線 3238	2 B 9123

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)



## 1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ、 図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ、 図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ、 図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則3.1(b)という翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	5-50	有
	請求の範囲	1-4	無
進歩性(I S)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-50	無
産業上の利用可能性(I A)	請求の範囲	1-50	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

(1) 請求の範囲1-4について新規性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献1(K. Duff et al.)には、プレセニリン-1タンパク質のアミノ酸配列においてM146L又はM146Vの変異を有する変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。

また、国際調査報告で引用した文献2(D. R. Borchelt et al.)には、プレセニリン-1タンパク質のアミノ酸配列においてA246Eの変異を有する変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。

(2) 請求の範囲5-11について進歩性がないとする理由

文献1及び文献2には、プレセニリン-1タンパク質のアミノ酸配列においてM146L、M146VまたはA246Eの変異を有する変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。一方、国際調査報告で引用した文献3(M. Citron et al.)及び文献4(J. Hardy et al.)には、アルツハイマー病患者には請求の範囲4に記載された変異を有する変異プレセニリン-1が見出されることが記載されている。文献1や文献2に記載されたようなアルツハイマー病の病態モデル動物を作成するにあたって、導入する遺伝子として文献3や文献4に記載されている患者由来の変異プレセニリン-1タンパク質をコードする遺伝子を用いることは、当業者が文献1-4の記載に基づいて容易に推考し得る程度のことである。

(3) 請求の範囲12-15, 17, 34及び35について進歩性がないとする理由

文献1及び文献2に記載された変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが請求の範囲12-15に記載された特性を有するか否かは不明であるが、変異プレセニリン-1遺伝子が組み込まれたコピー数や染色体上の位置によって請求の範囲12-15に記載された特性を有するマウスが得られるであろうことは、当業者が容易に予測しうる程度のことである。

(4) 請求の範囲16, 30及び34について進歩性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献6(山村研一ら)には、相同組換え法を用いて点突然変異等の小さな変異の導入や遺伝子の置換を行うことが記載されている。文献1や文献2に記載された変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスを作成するにあたって、文献6記載の相同遺伝子組換え法を採用することは当業者が容易になし得ることである。

(5) 請求の範囲18について進歩性がないとする理由

遺伝子変異動物を作成するにあたって、目的とする遺伝子だけでなくマーカー遺





## VII. 国際出願の不備

この国際出願の形式又は内容について、次の不備を発見した。

請求の範囲 1.0 の「第 4.3.6 番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した」の記載と  
請求の範囲 1.1 の「M239V の変異を有する」の記載は整合していない。



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

伝子を併せて導入することは広く行われている。本請求の範囲は文献1又は文献2に記載された遺伝子変異マウスを作成するにあたって、上記周知技術を適用したものにすぎない。

(6) 請求の範囲19-26及び28について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。所望の遺伝子変異動物を作成するためにプラスミドを構築することは広く行われている。

(7) 請求の範囲27について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。また、遺伝子変異動物を作成するにあたって loxP配列を使用することは、例えば国際調査報告で引用した文献7 (U. A. K. Betz et al.) に記載されているように周知である。

(8) 請求の範囲29-32について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。遺伝子変異動物を作成するためにプラスミドを胚に導入することは広く行われている。

(9) 請求の範囲33について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。遺伝子変異動物から培養細胞を得ることは広く行われている。

(10) 請求の範囲36-45について進歩性がないとする理由

病態モデル動物を用いて薬剤の評価を行うことは広く行われている。本請求の範囲記載の発明は、上記周知技術において文献1や文献2に記載されたマウスを用いたものにすぎない。

(11) 請求の範囲46-50について進歩性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献3には、本請求の範囲と同様のマウスが記載されている。





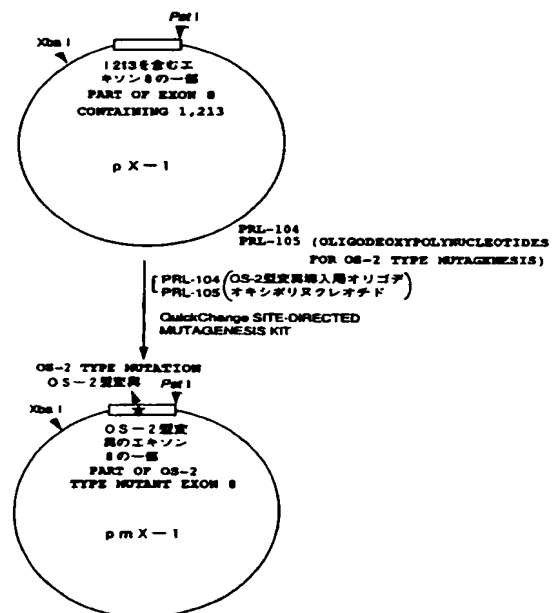
<p>(51) 国際特許分類6 A01K 67/027, A61K 45/00, C12N 15/12, G01N 33/15</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/34670</p> <p>(43) 国際公開日 1999年7月15日(15.07.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00015</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月7日(07.01.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/2191 1998年1月8日(08.01.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 武田雅俊(TAKEDA, Masatoshi)[JP/JP] 〒569-1021 大阪府高槻市弥生が丘町49の25 Osaka, (JP) 竹田潤二(TAKEDA, Junji)[JP/JP] 〒565-0824 大阪府吹田市山田西3丁目38の9 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title: GENE MUTANT ANIMALS

(54) 発明の名称 遺伝子変異動物

(57) Abstract

Gene mutant animals such as mice having a mutant presenilin-1 gene which contains a DNA sequence encoding a mutant presenilin-1 protein having an amino acid sequence derived from that of presenilin-1 protein by substitution of one amino acid (for example, one wherein isoleucine at the 213-position of mouse-derived presenilin-1 protein has been substituted by another amino acid such as threonine). These animals are useful as model animals being pathologically closer to human patients with Alzheimer's diseases.



(57)要約

プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白 (例えばマウス由来のプレセニリン-1 蛋白の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸、例えばスレオニンに置換した変異プレセニリン-1 蛋白) をコードするDNA配列をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有するマウスなどの遺伝子変異動物。ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR トルコ
BJ ベナン	GR キリシャ	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	MN モンゴル	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MW マラウイ	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CH スイス	IN インド	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	PL ポーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PT ポルトガル	
CY キプロス	KG キルギスタン	RO ルーマニア	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RU ロシア	
DE ドイツ	KR 韓国	SD スーダン	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SE スウェーデン	
EE エストニア	LC セントルシア		

## PCT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 02 February 1999 (02.02.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 98291M	<b>International application No.</b> PCT/JP99/00015

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (for all designated States except US)  
TAKEDA, Masatoshi et al (for US)

International filing date : 07 January 1999 (07.01.99)  
Priority date(s) claimed : 08 January 1998 (08.01.98)  
Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 22 January 1999 (22.01.99)  
List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW  
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM  
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG  
National : AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	<b>Authorized officer:</b>  K. Takeda
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38





# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INFORMATION CONCERNING ELECTED OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 09 August 1999 (09.08.99)		
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 98291M		<b>IMPORTANT INFORMATION</b>
<b>International application No.</b> PCT/JP99/00015	<b>International filing date (day/month/year)</b> 07 January 1999 (07.01.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 08 January 1998 (08.01.98)
<b>Applicant</b> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, GB, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CU, DK, EE, ES, FI, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed **until 31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p style="text-align: center;"><b>The International Bureau of WIPO</b>          34, chemin des Colombettes          1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p style="text-align: center;">Sean Taylor</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
--	--



## PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 23 February 1999 (23.02.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 98291M	
International application No. PCT/JP99/00015	International filing date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 08 January 1998 (08.01.98)
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
08 Janu 1998 (08.01.98)	10/2191	JP	19 Febr 1999 (19.02.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Sean Taylor <i>SAT</i>  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



# PCT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

<p>To:</p> <p>IMAMURA, Masazumi</p> <p>KRF Building, 5th floor</p> <p>5-5, Kyobashi 1-chome</p> <p>Chuo-ku</p> <p>Tokyo 104-0031</p> <p>JAPON</p> <p>1999. 7. 25</p> <p>SHO</p>
---

<p>Date of mailing (day/month/year)</p> <p>15 July 1999 (15.07.99)</p>		<p>Applicant's or agent's file reference</p> <p>98291M</p>		<p><b>IMPORTANT NOTICE</b></p>	
<p>International application No.</p> <p>PCT/JP99/00015</p>	<p>International filing date (day/month/year)</p> <p>07 January 1999 (07.01.99)</p>	<p>Priority date (day/month/year)</p> <p>08 January 1998 (08.01.98)</p>			
<p>Applicant</p> <p>DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al</p>					

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,EP,IL,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD, SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZW  
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 15 July 1999 (15.07.99) under No. WO 99/34670

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO</p> <p>34, chemin des Colombettes</p> <p>1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--



特許協力条約

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)

出願人代理人 今村 正純  あて名  〒 104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 塩澤・今村特許事務所		殿  PCT見解書  (法第13条) [PCT規則66]
出願人又は代理人 の書類記号 98291M		発送日 (日.月.年) 06.04.99
国際出願番号 PCT/J P 99/00015	国際出願日 (日.月.年) 07.01.99	優先日 (日.月.年) 08.01.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ° A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15		
出願人 (氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

1. これは、この国際予備審査機関が作成した <u>1</u> 回目の見解書である。
2. この見解書は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 見解の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見
3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。 いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。 どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。 なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び、又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。 応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により <u>08.05.00</u> である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA, J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長 井 啓 子 電話番号 03-3581-1101 内線 6944	2B 9123
--	--	---------





## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則3.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	5 - 50	有
	請求の範囲	1 - 4	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1 - 50	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 50	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

(1) 請求の範囲1-4について新規性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献1 (K. Duff et al.) には、プレセリニン-1タンパク質のアミノ酸配列においてM146L又はM146Vの変異を有する変異プレセリニン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。

また、国際調査報告で引用した文献2 (D. R. Borchelt et al.) には、プレセリニン-1タンパク質のアミノ酸配列においてA246Eの変異を有する変異プレセリニン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。

(2) 請求の範囲5-11について進歩性がないとする理由

文献1及び文献2には、プレセリニン-1タンパク質のアミノ酸配列においてM146L、M146VまたはA246Eの変異を有する変異プレセリニン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。一方、国際調査報告で引用した文献3 (M. Citron et al) 及び文献4 (J. Hardy et al.) には、アルツハイマー病患者には請求の範囲4に記載された変異を有する変異プレセリニン-1が見出されることが記載されている。文献1や文献2に記載されたようなアルツハイマー病の病態モデル動物を作成するにあたって、導入する遺伝子として文献3や文献4に記載されている患者由来の変異プレセリニン-1タンパク質をコードする遺伝子を用いることは、当業者が文献1-4の記載に基づいて容易に推考し得る程度のことである。

(3) 請求の範囲12-15, 17, 34及び35について進歩性がないとする理由

文献1及び文献2に記載された変異プレセリニン-1遺伝子を有するマウスが請求の範囲12-15に記載された特性を有するか否かは不明であるが、変異プレセリニン-1遺伝子が組み込まれたコピー数や染色体上の位置によって請求の範囲12-15に記載された特性を有するマウスが得られるであろうことは、当業者が容易に予測しうる程度のことである。

(4) 請求の範囲16, 30及び34について進歩性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献6 (山村研一ら) には、相同遺伝子組換え法を用いて点突然変異等の小さな変異の導入や遺伝子の置換を行うことが記載されている。文献1や文献2に記載された変異プレセリニン-1遺伝子を有するマウスを作成するにあたって、文献6記載の相同遺伝子組換え法を採用することは当業者が容易になし得ることである。

(5) 請求の範囲18について進歩性がないとする理由



## VII. 国際出願の不備

この国際出願の形式又は内容について、次の不備を発見した。

請求の範囲 10 の「第 436 番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した」の記載と  
請求の範囲 11 の「M239V の変異を有する」の記載は整合していない。



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

(5) 請求の範囲 18 について進歩性がないとする理由

遺伝子変異動物を作成するにあたって、目的とする遺伝子だけでなくマーカー遺伝子を併せて導入することは広く行われている。本請求の範囲は文献 1 又は文献 2 に記載された遺伝子変異マウスを作成するにあたって、上記周知技術を適用したものにすぎない。

(6) 請求の範囲 19 - 26 及び 28 について進歩性がないとする理由

上記コメント (2) を参照のこと。所望の遺伝子変異動物を作成するためにプラスミドを構築することは広く行われている。

(7) 請求の範囲 27 について進歩性がないとする理由

上記コメント (2) を参照のこと。また、遺伝子変異動物を作成するにあたって loxP 配列を使用することは、例えば国際調査報告で引用した文献 7 (U. A. K. Betz et al.) に記載されているように周知である。

(8) 請求の範囲 29 - 32 について進歩性がないとする理由

上記コメント (2) を参照のこと。遺伝子変異動物を作成するためにプラスミドを胚に導入することは広く行われている。

(9) 請求の範囲 33 について進歩性がないとする理由

上記コメント (2) を参照のこと。遺伝子変異動物から培養細胞を得ることは広く行われている。

(10) 請求の範囲 36 - 45 について進歩性がないとする理由

病態モデル動物を用いて薬剤の評価を行うことは広く行われている。本請求の範囲記載の発明は、上記周知技術において文献 1 や文献 2 に記載されたマウスを用いた物にすぎない。

(11) 請求の範囲 46 - 50 について進歩性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献 3 (M. Citron et al.) には、本請求の範囲と同様のマウスが記載されている。





特 許 協 力 条 約


P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[P C T 36条及びP C T規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 98291M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式P C T / I P E A / 416）を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 99 / 00015	国際出願日 (日.月.年) 07.01.99	優先日 (日.月.年) 08.01.98
国際特許分類 (I P C) I n t. C l. <sup>9</sup> A 01 K 67 / 027, A 61 K 45 / 00, C 12 N 15 / 12, G 01 N 33 / 15		
出願人 (氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (P C T 36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (P C T 規則70.16及びP C T実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> P C T 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.01.99	国際予備審査報告を作成した日 24.06.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  長 井 啓 子 	2 B 9 1 2 3
電話番号 03-3581-1101 内線 3238		

様式P C T / I P E A / 409 (表紙) (1998年7月)



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならないが、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	5-50	有
請求の範囲	1-4	無

進歩性(IS)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-50	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-50	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## (1) 請求の範囲1-4について新規性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献1(K. Duff et al.)には、プレセニリン-1タンパク質のアミノ酸配列においてM146L又はM146Vの変異を有する変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。

また、国際調査報告で引用した文献2(D. R. Borchelt et al.)には、プレセニリン-1タンパク質のアミノ酸配列においてA246Eの変異を有する変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。

## (2) 請求の範囲5-11について進歩性がないとする理由

文献1及び文献2には、プレセニリン-1タンパク質のアミノ酸配列においてM146L、M146VまたはA246Eの変異を有する変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが記載されている。一方、国際調査報告で引用した文献3(M. Citron et al.)及び文献4(J. Hardy et al.)には、アルツハイマー病患者には請求の範囲4に記載された変異を有する変異プレセニリン-1が見出されることが記載されている。文献1や文献2に記載されたようなアルツハイマー病の病態モデル動物を作成するにあたって、導入する遺伝子として文献3や文献4に記載されている患者由来の変異プレセニリン-1タンパク質をコードする遺伝子を用いることは、当業者が文献1-4の記載に基づいて容易に推考し得る程度のことである。

## (3) 請求の範囲12-15, 17, 34及び35について進歩性がないとする理由

文献1及び文献2に記載された変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスが請求の範囲12-15に記載された特性を有するか否かは不明であるが、変異プレセニリン-1遺伝子が組み込まれたコピー数や染色体上の位置によって請求の範囲12-15に記載された特性を有するマウスが得られるであろうことは、当業者が容易に予測しうる程度のことである。

## (4) 請求の範囲16, 30及び34について進歩性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献6(山村研一ら)には、相同組換え法を用いて点突然変異等の小さな変異の導入や遺伝子の置換を行うことが記載されている。文献1や文献2に記載された変異プレセニリン-1遺伝子を有するマウスを作成するにあたって、文献6記載の相同遺伝子組換え法を採用することは当業者が容易になし得ることである。

## (5) 請求の範囲18について進歩性がないとする理由

遺伝子変異動物を作成するにあたって、目的とする遺伝子だけでなくマーカー遺



## VII. 国際出願の不備

この国際出願の形式又は内容について、次の不備を発見した。

請求の範囲10の「第436番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した」の記載と  
請求の範囲11の「M239Vの変異を有する」の記載は整合していない。





補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

伝子を併せて導入することは広く行われている。本請求の範囲は文献1又は文献2に記載された遺伝子変異マウスを作成するにあたって、上記周知技術を適用したものにすぎない。

(6) 請求の範囲19-26及び28について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。所望の遺伝子変異動物を作成するためにプラスミドを構築することは広く行われている。

(7) 請求の範囲27について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。また、遺伝子変異動物を作成するにあたって loxP配列を使用することは、例えば国際調査報告で引用した文献7 (U. A. K. Betz et al.) に記載されているように周知である。

(8) 請求の範囲29-32について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。遺伝子変異動物を作成するためにプラスミドを胚に導入することは広く行われている。

(9) 請求の範囲33について進歩性がないとする理由

上記コメント(2)を参照のこと。遺伝子変異動物から培養細胞を得ることは広く行われている。

(10) 請求の範囲36-45について進歩性がないとする理由

病態モデル動物を用いて薬剤の評価を行うことは広く行われている。本請求の範囲記載の発明は、上記周知技術において文献1や文献2に記載されたマウスを用いたものにすぎない。

(11) 請求の範囲46-50について進歩性がないとする理由

国際調査報告で引用した文献3には、本請求の範囲と同様のマウスが記載されている。



**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>98291M</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP99/00015</b>	International filing date ( <i>day month year</i> ) <b>07 January 1999 (07.01.1999)</b>	Priority date ( <i>day month year</i> ) <b>08 January 1998 (08.01.1998)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>A01K 67/027, A61K 45/00, C12N 15/12, G01N 33/15</b>		
Applicant <b>DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>07 January 1999 (07.01.1999)</b>	Date of completion of this report <b>24 June 1999 (24.06.1999)</b>
Name and mailing address of the IPEA JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No. (81-3) 3581 1101



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/JP99/00015

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17)

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00015

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	5-50	YES
	Claims	1-4	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-50	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-50	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

## (1) Reason why Claims 1-4 do not appear to be novel.

Document 1 (K. Duff et al.) cited in the international search report describes a mouse having a mutant presenilin-1 gene with mutations at M146L and M146V in the presenilin-1 protein amino acid sequence.

Document 2 (D. R. Borchelt et al.) cited in the international search report describes a mouse having a mutant presenilin-1 gene with a mutation at A246E in the presenilin-1 protein amino acid sequence.

## (2) Reason why Claims 5-11 do not appear to involve an inventive step

Documents 1 and 2 describe mice having a mutant presenilin-1 gene with mutations at M146L, M146V, and A246E in the presenilin-1 protein amino acid sequence. Document 3 (M. Citron et al.) and document 4 (J. Hardy et al.) cited in the international search report describe the discovery of a mutant presenilin-1 gene in patients with Alzheimer's disease that has the mutations described in Claim 4. In preparing Alzheimer's disease model animals such as the ones described in documents 1 and 2, the use of a gene that codes for the mutant presenilin-1 proteins derived from the patients described in documents 3 and 4 as the transducing gene can easily be predicted by persons skilled in the art based on the descriptions in documents 1-4.

## (3) Reason why Claims 12-15, 17, 34 and 35 do not appear to involve an inventive step

It is unclear whether the mice having the mutant presenilin-1 genes described in documents 1 and 2 have the properties described in Claims 12-15, but persons skilled in the art can easily predict that mice having the properties described in Claims 12-15 can be obtained by the number of copies and locations on the chromosomes where the mutant presenilin-1 gene is inserted.

## (4) Reason why Claims 16, 30 and 34 do not appear to involve an inventive step

Document 6 (K. Yamamura, et al.) cited in the international search report describes use of the homologous gene recombination procedure to insert small mutations such as point mutations and





**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of Box V (Citations and explanations):

gene substitution. Persons skilled in the art can easily use the homologous gene recombination procedure described in document 6 to prepare a mouse having the mutant presenilin-1 gene described in documents 1 and 2.

(5) Reason why Claim 18 does not appear to involve an inventive step

The insertion of a marker gene together with a target gene is widely used in preparing gene mutant animals. This claim merely applies well-known technology in preparing the gene mutant mouse described in documents 1 and 2.

(6) Reason why Claims 19-26 and 28 do not appear to involve an inventive step

See the comments in item (2) above. The construction of a plasmid in order to prepare a gene mutant animal is a widely used procedure.

(7) Reason why Claim 27 does not appear to involve an inventive step

See the comments in item (2) above. The use of the loxP sequence is well-known in the preparation of gene mutant animals, as is described, for example, in document 7 (U. A. K. Betz et al.) cited in the international search report.

(8) Reason why Claims 29-32 do not appear to involve an inventive step

See the comments in item (2) above. The introduction of a plasmid into an embryo to prepare a gene mutant animal is a widely used procedure.

(9) Reason why Claim 33 does not appear to involve an inventive step

See the comments in item (2) above. Obtaining cultured cells from gene mutant animals is a widely used procedure.

(10) Reason why Claims 36-45 do not appear to involve an inventive step

The use of disease animal models to evaluate pharmaceuticals is a widely used procedure. The invention in these claims merely uses the mice described in documents 1 and 2 in well-known technology.

(11) Reason why Claims 46-50 do not appear to involve an inventive step

Document 3 cited in the international search report describes the same mouse as this claim.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No

PCT/JP99/00015

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The phrases "amino acid No. 436 replaced another amino acid" in Claim 10 and "having an M239V mutation" in Claim 11 do not match.



# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum)

98291M

### Box No. I TITLE OF INVENTION

GENE MUTANT ANIMALS

### Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku,  
Tokyo 103-8234 JAPAN

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (i.e. country) of nationality:  
JAPAN

State (i.e. country) of residence:  
JAPAN

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

### Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TAKEDA Masatoshi  
49-25, Yayoigaoka-cho, Takatsuki-shi,  
Osaka 569-1021 JAPAN

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
JAPAN

State (i.e. country) of residence:  
JAPAN

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

### Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

9621 IMAMURA Masazumi  
9263 SHIOZAWA Hisao  
9584 KAMATA Junji

5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome,  
Chuo-ku, Tokyo 104-0031 JAPAN

Telephone No.

03-3271-1331

Facsimile No.

03-3271-1410

Teleprinter No.

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.



## Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TAKEDA Junji  
38-9, Yamada-nishi 3-chome, Suita-shi,  
Osaka 565-0824 JAPAN

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
JAPAN

State (i.e. country) of residence:  
JAPAN

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.





Box No.V DESIGNATION STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania                              | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia                              | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria                              | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia                            | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan                           | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina               | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados                             | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria                             |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil                               | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus                              | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China                                | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba                                 | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic                       | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany                              | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark                              | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia                              | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain                                | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland                              | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom                       | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia                              | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana                                | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia                               | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan                                |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau                                   | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia                              | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary                              | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia                            | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel                               | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland                              | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                                |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya                                | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam                                  |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea           | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia                                |
|   | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan                           |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia                          |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka                            |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia                              |  |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☒ GD Grenada
- ☒ IN India

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



<b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 08/01/98	H10-2191	JAPAN		
item (2)				
item (3)				

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>			
<b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b> (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / JP	<b>Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):</b> Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office)		

<b>Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING</b>	
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 32 claims : 8 abstract : 1 drawings : 8 sequence listing part of description : 10 Total number of sheets : 63	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify):
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: JAPANESE

<b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>		
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).		
IMAMURA Masazumi	SHIOZAWA Hisao	KAMATA Junji

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received: 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	



# PCT

## FEE CALCULATION SHEET

### Annex to the Request

For receiving Office use only

International application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's  
file reference

98291M

Applicant

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

#### CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE . . . . . ¥95,000 (T+S)  T

2. SEARCH FEE . . . . .  S

International search to be carried out by

(If two or more International Searching Authorities are competent in relation to the international application, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

##### Basic Fee

The international application contains 63 sheets.

first 30 sheets . . . . . ¥62,800  b<sub>1</sub>

33 x ¥1,450 = ¥47,850  b<sub>2</sub>  
remaining sheets additional amount

Add amounts entered at b<sub>1</sub> and b<sub>2</sub> and enter total at B . . . . . ¥110,650  B

##### Designation Fees

The international application contains 76 designations.

10 x ¥14,500 = ¥145,000  D  
number of designation fees amount of designation fee  
payable (maximum 11)

Add amounts entered at B and D and enter total at I . . . . . ¥255,650  I

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the sum of the amounts entered at B and D.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT . . . . .  P

5. TOTAL FEES PAYABLE

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box . . . . . ¥350,650  
TOTAL

☐ The designation fees are not paid at this time.

#### MODE OF PAYMENT

☐ authorization to charge  
deposit account (see below)

☐ bank draft

☐ coupons

☐ cheque

☐ cash

☐ other (specify):

☐ postal money order

☐ revenue stamps

#### DEPOSIT ACCOUNT AUTHORIZATION (this mode of payment may not be available at all receiving Offices)

The RO/ ☐ is hereby authorized to charge the total fees indicated above to my deposit account.

☐ is hereby authorized to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above to my deposit account.

☐ is hereby authorized to charge the fee for preparation and transmittal of the priority document to the International Bureau of WIPO to my deposit account.

Deposit Account Number

Date (day/month/year)

Signature



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 09 August 1999 (09.08.99)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/00015	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 98291M
<b>International filing date</b> (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 08 January 1998 (08.01.98)
<b>Applicant</b> TAKEDA, Masatoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
07 January 1999 (07.01.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Sean Taylor</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	---

The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present.



特許協力条約に基づく出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理官庁書記人欄

国際出願番号

国際出願日

(受付印)

出願人又は代理人の書類記号  
(希望する場合、最大12字)

98291M



第 I 欄 発明の名称

遺伝子変異動物

第 II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

第一製薬株式会社

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

〒103-8234 日本国東京都中央区日本橋3丁目14番10号

14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku,

Tokyo 103-8234 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:



すべての指定国



米国を除くすべての指定国



米国のみ



追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田 雅俊

TAKEDA Masatoshi

〒569-1021 日本国大阪府高槻市弥生が丘町49の25

49-25, Yayoigaoka-cho, Takatsuki-shi,

Osaka 569-1021 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:



出願人のみである。



出願人及び発明者である。



発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:



すべての指定国



米国を除くすべての指定国



米国のみ



追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が結果に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のため名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:



代理人



共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

9621 弁理士 今村 正純 IMAMURA Masazumi

9263 弁理士 塩澤 寿夫 SHIOZAWA Hisao

9584 弁理士 釜田 淳爾 KAMATA Junji

〒104-0031 日本国東京都中央区京橋1丁目5番5号  
K R F ビル5階

5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1 chome,  
Chuo-ku, Tokyo 104-0031 JAPAN

電話番号:

03-3271-1331

ファクシミリ番号:

03-3271-1410

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す



第1欄(国)の指定、その他の欄(出願人又は発明者)

この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

竹田 潤二

TAKEDA Junji

〒565-0824 日本国大阪府吹田市山田西3丁目38の9

38-9, Yamada-nishi 3-chome, Suita-shi,

Osaka 565-0824 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)： 日本国 JAPAN

住所(国名)： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。



## 第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき、次の指定を行う（該当する□に印を付すこと。少なくとも1つの□に印を付すこと）。

## 広域成半半半

- ☐ **AP** **ARIPPO**特許 : **GH** ガーナ Ghana, **GM** ガンビア Gambia, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラブプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **EA** **ユーラシア**特許 : **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギス Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **EP** **ヨーロッパ**特許 : **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH and LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **CY** キプロス Cyprus, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **OA** **OAPI**特許 : **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベナン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** コートジボアール Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **ML** マリ Mali, **MR** モリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国（他の種別の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

## [国内]特許 (他の種別の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> <b>AL</b> アルバニア Albania  | <input type="checkbox"/> <b>LT</b> リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> <b>AM</b> アルメニア Armenia  | <input type="checkbox"/> <b>LU</b> ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input type="checkbox"/> <b>AT</b> オーストリア Austria   | <input type="checkbox"/> <b>LV</b> ラトヴィア Latvia  |
| <input type="checkbox"/> <b>AU</b> オーストラリア Australia                                      | <input type="checkbox"/> <b>MD</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input type="checkbox"/> <b>AZ</b> アゼルバイジャン Azerbaijan                                    | <input type="checkbox"/> <b>MG</b> マダガスカル Madagascar   |
| <input type="checkbox"/> <b>BA</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                   | <input type="checkbox"/> <b>MK</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> <b>BB</b> バルバドス Barbados   | <input type="checkbox"/> <b>MN</b> モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> <b>BG</b> ブルガリア Bulgaria   | <input type="checkbox"/> <b>MW</b> マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> <b>BR</b> ブラジル Brazil  | <input type="checkbox"/> <b>MX</b> メキシコ Mexico   |
| <input type="checkbox"/> <b>BY</b> ベラルーシ Belarus  | <input type="checkbox"/> <b>NO</b> ノールウェー Norway   |
| <input type="checkbox"/> <b>CA</b> カナダ Canada   | <input type="checkbox"/> <b>NZ</b> ニュージーランド New Zealand  |
| <input type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> スイス及びリヒテンシュタイン<br>Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> <b>PL</b> ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> <b>CN</b> 中国 China   | <input type="checkbox"/> <b>PT</b> ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> <b>CU</b> キューバ Cuba  | <input type="checkbox"/> <b>RO</b> ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> <b>CZ</b> チェコ Czech Republic                                     | <input type="checkbox"/> <b>RU</b> ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> <b>DE</b> ドイツ Germany  | <input type="checkbox"/> <b>SD</b> スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> <b>DK</b> デンマーク Denmark  | <input type="checkbox"/> <b>SE</b> スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> <b>EE</b> エストニア Estonia  | <input type="checkbox"/> <b>SG</b> シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> <b>ES</b> スペイン Spain   | <input type="checkbox"/> <b>SI</b> スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> <b>FI</b> フィンランド Finland   | <input type="checkbox"/> <b>SK</b> スロヴァキア Slovakia   |
| <input type="checkbox"/> <b>GB</b> 英国 United Kingdom                                      | <input type="checkbox"/> <b>SL</b> シェラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input type="checkbox"/> <b>GE</b> ジョージア Georgia  | <input type="checkbox"/> <b>TJ</b> タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> <b>GH</b> ガーナ Ghana  | <input type="checkbox"/> <b>TM</b> トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>GM</b> ガンビア Gambia  | <input type="checkbox"/> <b>TR</b> トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> <b>GW</b> ギニア・ビサウ Guinea-Bissau                                  | <input type="checkbox"/> <b>TT</b> トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> <b>HR</b> クロアチア Croatia  | <input type="checkbox"/> <b>UA</b> ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> <b>HU</b> ハンガリー Hungary  | <input type="checkbox"/> <b>UG</b> ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> <b>ID</b> インドネシア Indonesia                                       | <input type="checkbox"/> <b>US</b> 米国 United States of America                                 |
| <input type="checkbox"/> <b>IL</b> イスラエル Israel   | <input type="checkbox"/> <b>UZ</b> ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input type="checkbox"/> <b>IS</b> アイスランド Iceland   | <input type="checkbox"/> <b>VN</b> ヴイエトナム Viet Nam   |
| <input type="checkbox"/> <b>JP</b> 日本 Japan   | <input type="checkbox"/> <b>YU</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> <b>KE</b> ケニア Kenya  | <input type="checkbox"/> <b>ZW</b> ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input type="checkbox"/> <b>KG</b> キルギス Kyrgyzstan  |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KR</b> 韓国 Republic of Korea                                   |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KZ</b> カザフスタン Kazakhstan                                      |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LC</b> セント・ルシア Saint Lucia                                    |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LK</b> スリランカ Sri Lanka  |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LR</b> リベリア Liberia   |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LS</b> レソト Lesotho  |  |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- ☐ **GD** グレナダ Grenada
- ☐ **IN** インド India

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除外の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）



第VI欄 優先権主張 1. 優先権主張の権利 (優先権) が追記欄に記載されている。

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 08. 01. 98	平成10年特許願 第2191号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☒ 上記 ( ) の番号の先の出願 (ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る) のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証書を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁 (日本特許庁の長官) に対して請求している。

(1)

\* 先の出願が、A R I P O の特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない (規則4. 10 (b) (i))。追記欄を参照。

## 第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 ( I S A ) の選択

先の出願調査結果の引用を請求 ; 当該調査の結果 (先の出願が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日 (日、月、年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

I S A / J P

## 第VIII欄 組合欄 : 出願者の合意

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 ..... 4 枚  
明細書 (配列表を除く) ..... 32 枚  
請求の範囲 ..... 8 枚  
要約書 ..... 1 枚  
図面 ..... 8 枚  
明細書の配列表 ..... 10 枚  
合計 ..... 63 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙 5. ☐ 優先権書類 (上記VI欄の ( ) の番号を記載する)  
2. ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 6. ☐ 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する)  
3. ☒ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 7. ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面  
4. ☐ 別個の記名押印された委任状 8. ☒ スクレオチド又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク)  
9. ☒ その他 (名前を詳細に記載する)  
優先権書類送付請求書、陳述書  
フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面 :

本国際出願の使用言語名 : 日本語

## 第IX欄 提出者の記名押印

人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

今村 正純



塩澤 寿夫



釜田 淳爾



## 受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された  
国際調査機関

I S A / J P

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に  
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

## 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 P C I / R O / 101 (最終用紙) (1998年7月)





P C T

手 続 料 金 領 収 書

願 書 附 属 書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

98291M

受理官庁の日付印

出願人

第一製薬株式会社

## 所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）  
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）  
（送付手数料【T】及び調査手数料【S】の合計）

95,000 円 T+S

## 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 63 枚

最初の30枚まで

62,800 円 b1

33 × 1,450 =

47,850 円 b2

30枚を超える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

110,650 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 76

10 × 14,500 =

145,000 円 D

支払うべき指定手数料  
の数（上限は11）  
（注4）1指定当たり手数料  
（円）

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をEに記入

255,650 円 E

## 4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びEに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

350,650 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄で印刷を付した頁の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、11指定以上は一律11とする。



## 明 細 書

### 遺伝子変異動物

#### 技術分野

本発明は、遺伝子導入動物に関するものである。より詳しくは、ヒト・アルツハイマー病を惹起するプレセニリン遺伝子の変異を導入したプレセニリン遺伝子導入動物に関する。

#### 背景技術

アルツハイマー病は進行性の痴呆症状を呈する疾患であり、脳内での著しく多数の老人斑の出現と神経原線維変化の神経細胞内蓄積を病理組織学的特徴とし、緩徐に神経細胞が障害され脱落する神経変性疾患である。アルツハイマー病は高齢者に発症することが多く、加齢とともに罹患者の比率が増大することが知られている。現在のところアルツハイマー病の根治は不可能であり、将来的な高齢者人口の急増に備えてアルツハイマー病に対する治療や予防のための方法、並びにアルツハイマー病に対して有効な予防・治療剤の早急な開発が切望されている。

老人斑は種々の成分を含む神経細胞外の沈着物であり、アミロイド $\beta$ タンパク(A $\beta$ )と呼ばれる39～42個のアミノ酸残基からなるペプチドを主成分としている。アミロイド $\beta$ はアミロイド前駆体タンパク(amyloid precursor protein : APP)より $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼと仮称されているプロテアーゼで切断されて生じる。老人斑では、アミロイド $\beta$ が $\beta$ シート構造をとった堅固な構造物として沈着している。老人斑はび慢性老人斑と呼ばれる“しみ”状の沈着から始まるが、この段階では神経変性は生じておらず、更にび慢性老人斑が堅固な沈着物となるとともに、神経変性や神経細胞の脱落が生じることによって痴呆などのアルツハイマー病の症状が現れるものと考えられている。アミロイド $\beta$ としては主に40アミノ酸残基よりなるA $\beta$ 40と42アミノ酸残基より



なるA $\beta$ 42が存在する。細胞が生成するアミロイド $\beta$ の大部分はA $\beta$ 40であり、A $\beta$ 42は僅かに存在しているにすぎないが、A $\beta$ 42の方が凝集性が高く、A $\beta$ 40と比較して老人斑形成に果たす役割は大きいと考えられている（玉岡：内科77巻、843頁、1996年）。

アルツハイマー病には常染色体優性の遺伝を示す家族性の発症が認められる。この家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として最初に見つけられたものは、1991年第717番目のアミノ酸残基がバリンからイソロイシンに変異しているAPPの突然変異体であり、この遺伝子は21番染色体上に存在する（Goate A. 等：Nature 349巻、704頁、1991年）。

この他、アルツハイマー病の原因となるAPPの突然変異体として、同じく第717番目のアミノ酸残基がフェニルアラニンに変換したもの（Murrell J. 等：Science 254巻、97頁、1991年）、同じ位置のアミノ酸残基がグリシンへ変異したもの（Chartier, Harlin 等：Nature 353巻、844頁、1991年）、第670番目と第671番目の2アミノ酸残基がリジン・メチオニンからアスパラギン・ロイシンに変異したもの（Mullan M. 等：Nature Genet. 1巻、345頁、1992年）、第692番目のアミノ酸残基がアラニンからグリシンに変異したもの（Hendrick L. 等：Nature Genet. 1巻、218頁、1992年）等が見い出されている。

家族性アルツハイマー病の原因因子あるいは危険因子としてアポリポタンパクE（apo E）が1993年に報告された。すなわち、19番染色体上に遺伝子が存在するapo Eのアイソマーのうち第112番目のアミノ酸残基がアルギニンであり、第158番目のアミノ酸残基がアルギニンであるapo E4を保有する者の比率がアルツハイマー病患者では健常人と比較して有意に高いことが見つけられた（Corder E. H. 等：Science 261巻、921頁、1993年）。

その後、1995年にアルツハイマー病の新たな原因遺伝子として、14番染色体上に存在する「プレセリニン-1」（PS-1；当初はS182と呼ばれていた）の遺伝子（Sherrington R. 等：Nature 375巻、754頁、1995年）の突然変異体および



1 番染色体上に存在する「プレセニリン-2」(PS-2;当初はE5-1あるいはSTM-2と呼ばれていた)の遺伝子(Rogaev E. I.等: Nature 376 巻、775 頁、1995年)の突然変異体が見いだされた(本明細書において、それぞれの遺伝子を「プレセニリン-1 遺伝子」及び「プレセニリン-2 遺伝子」と呼ぶ。また、それらの遺伝子産物をそれぞれ「プレセニリン-1 蛋白」及び「プレセニリン-2 蛋白」、又は「PS-1」及び「PS-2」と呼ぶ。)

プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白はそれぞれ 467 アミノ酸残基および 448 アミノ酸残基よりなる7回(又は8回)膜貫通型の1次構造を有しており、膜タンパクとして存在していると推測されている。両者のアミノ酸レベルでのホモロジーは高く、全体で67%、膜貫通部のみでは84%である。プレセニリン-1 蛋白の機能に関しては、線虫の sel-12 タンパクや SPE-4 タンパクとの高い相同性から、これらのタンパクと機能が類似している可能性が指摘されている。SPE-4 タンパクは線虫の精子形成過程に関与するタンパクであり、タンパクの輸送・貯蔵に関与しているとされている。

従って、プレセニリン-1 蛋白はAPPのような膜タンパクのプロセッシング、軸索輸送、膜小胞の膜との融合過程などに関与する可能性が考えられている。また、sel-12 は線虫の発生過程を制御している lin-12 の突然変異による発生異常を救済する遺伝子として発見された。lin-12 は細胞間情報伝達に関与していると考えられており、プレセニリン-1 蛋白も細胞間情報伝達のどこかに関与している可能性も示唆されている。

プレセニリン-1 蛋白について、最初の報告では、家族性アルツハイマー病の原因となる突然変異は5ヶ所のアミノ酸残基の置換であることが記載されている。この報告以降、本発明者等の報告したOS-2(第213番目のアミノ酸残基イソロイシンがスレオニンに変異)およびOS-3(第96番目のアミノ酸残基バリンがフェニルアラニンに変異)(Kamino K. 等: Neurosci. Lett. 208 巻、195 頁、1996 年)を初めとして、多くの家族性アルツハイマー病の家系から様々な個所での突然変異体が見つけられているおり、現在では30ヶ所以上で40種類





以上のアミノ酸残基の置換が知られている (Hardy : TINS 20 巻、154 頁、1997 年)。

現在ではプレセニリン-1 蛋白の突然変異は家族性アルツハイマー病の 70 ~ 80 % を占めると考えられている。PS-2 については 2 ヶ所の突然変異が報告されている。以上述べたように、PS-1 および PS-2 の突然変異体が家族性アルツハイマー病と深く関連していることが遺伝学的解析から証明されている。

一方、最近、プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異体がどのような機作でアルツハイマー病の発症の原因となっているかに関する研究も進められている。これらの突然変異体を持つアルツハイマー病患者の血清中や皮膚の腺維芽細胞の培養液 (Scheuner D. 等 : Nature Med. 2 巻、864 頁、1996 年)、プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異体で形質転換した培養細胞株の培溶液中 (Xia W. 等 : J. Biol. Chem. 272 巻、7977 頁、1997 年。Borchelt DR 等 : Neuron 17 巻、1005 頁、1996 年。Citron M. 等 : Nature Med. 3 巻、67 頁、1997 年)、及びプレセニリン-1 蛋白の突然変異体を持つ家族性アルツハイマー病患者の脳組織 (Lemere C. A. 等 : Nature Med. 2 巻、1146 頁、1996 年) において、 $A\beta$  40 は正常型のプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白に比べて殆ど変化が見られないが、 $A\beta$  42 は正常型のプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白と比較して大きく増加していることが報告されている。

すなわち、家族性アルツハイマー病をもたらすプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異は、老人斑の形成に大きな役割を果たすと考えられている  $A\beta$  42 を増加させることにより、アルツハイマー病を発症させる可能性が示されている。プレセニリン-1 蛋白の突然変異体をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスも作製されている (Duff K. 等 : Nature 383 巻、710 頁、1996 年。Borchelt DR. 等 : Neuron 17 巻、1005 頁、1996 年。Citron M. 等 : Nature Med. 3 巻、67 頁、1997 年)。これらのトランスジェニックマウスにおいてマウス脳内の  $A\beta$  42 が特異的に増加していることが報告されている。こ



の結果は、家族性アルツハイマー病をもたらすプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異体は、老人斑の形成に大きな役割を果たすと考えられているA $\beta$  42を増加させることにより、アルツハイマー病を発症させる可能性を強く支持するものである。しかしながら、これらのトランスジェニックマウスの報告ではトランスジェニックマウスの脳の組織学的検討に関する記載はされていない。これはトランスジェニックマウスで顕著な脳の組織学的変化が観察されていないことを推察させる。

一般的に、トランスジェニック動物は、対象とする遺伝子の生体内での機能を解析する手段としては有用である。しかしながら、導入した遺伝子の発現を量的・発現組織的・発生上の発現時期的に制御することは技術的に困難である。また、動物自体が持っている遺伝子が正常に発現しているために、トランスジェニック動物の体内では両方の遺伝子産物が混在した状態にあり、導入した遺伝子の機能解析が十分できないという問題もある。さらに、導入した遺伝子が特に過剰に発現される場合、本来生体内で果たしていない機能がトランスジェニック動物で現れてしまう場合があり、その結果、作製した遺伝子変異動物の解析に混乱をもたらすおそれがある等の難点もある。

トランスジェニック動物とは別に、対象とする遺伝子の機能を解析する手段としてノックアウト動物を利用することができる。ノックアウト動物は、動物自体が持っている対象の遺伝子を人工的に破壊して機能できない状態にしたものである。ノックアウト動物を詳細に解析することにより、対象としている遺伝子の生体内での機能を明らかにすることができる。しかしながら、破壊した遺伝子の産物の機能をノックアウト動物体内の別の遺伝子産物が代替するため、ホモ化してもノックアウト動物自体に特段の変化が現れてこないことがある。また、破壊した遺伝子の産物が動物の発生上・成育上必須であるためにホモでは致死となってしまう、成長可能なヘテロでは遺伝子の機能の詳細な解析が事実上不可能な場合があるという問題点も有している。



## 発明の開示

本発明の課題は、アルツハイマー病の病態モデル動物の作製にあたり、前記のような欠点を有するトランスジェニック動物ではなく、ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物を提供することにある。より具体的には、アルツハイマー病の原因遺伝子と考えられるプレセニリン遺伝子に変異を加えた遺伝子（変異プレセニリン遺伝子）を相同組換え法で導入することにより、変異プレセニリン蛋白を脳内で発現可能な遺伝子変異動物を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の遺伝子変異動物の作製方法、該作製方法に有用なプラスミド、及び該遺伝子変異動物を用いてアルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質を評価する方法を提供することにある。

本発明者らは、プレセニリン-1 蛋白の役割を解明するため、及びプレセニリン-1 遺伝子の突然変異がどのような機作でアルツハイマー病を引き起こすのか解析するため、マウス自体が持っているプレセニリン-1 遺伝子を上記OS-2 型の変異をもつプレセニリン-1 遺伝子と入れ換えたノックインマウスを作製した。その結果、この遺伝子変異動物ではトランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの持つ欠点を回避することができ、変異プレセニリン-1 遺伝子をもつ家族性アルツハイマー病の病因・病態解明に有用であることを見出した。本発明者らはさらに研究を続け、下記に述べる本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、変異プレセニリン遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物を提供するものであり、より好ましくは、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有する遺伝子変異動物を提供するものである。

また、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列、好ましくはマウス由来のプレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、次の番号：

第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第23



1番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番からなる群から選ばれる1又は2以上の箇所のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含むプレセニリン-1変異遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物；

及び、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、好ましくはマウス由来のプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、

A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436S、

(各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。以下、本明細書において、変異プレセニリン-1蛋白及び変異プレセニリン-2蛋白について同様に表示する。)

からなる群から選ばれる1又は2以上の変異を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

さらに、プレセニリン-1蛋白の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物；及び、プレセニリン-1蛋白の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレ





セニリンー1 蛋白をコードするDNA塩基配列を含む変異プレセニリンー1 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

これらの発明の好ましい態様に従い、  
プレセニリンー1 蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリンー1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物；

プレセニリンー1 蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリンー1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物；

プレセニリンー1 蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、XYZはイソロイシン以外のアミノ酸をコードする3塩基のコードを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリンー1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物が提供される。

別の観点からは、本発明により、プレセニリンー2 蛋白のアミノ酸配列において、第141番及び/又は436番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリンー2 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供され、その好ましい態様として、プレセニリンー2 蛋白のアミノ酸配列において、N141I及び/又はM239Vの変異を有する変異プレ



セニリン-2 蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

これらの遺伝子変異動物の好ましい態様として、アミロイドβ 蛋白の過剰発現が変異プレセニリン-1 遺伝子及び、又は変異プレセニリン-2 遺伝子に起因する上記の遺伝子変異動物；変異プレセニリン蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が、哺乳類動物の脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ 蛋白を生産させるものである上記遺伝子変異動物；哺乳類動物の齧歯類、好ましくはマウスである上記遺伝子変異動物；変異プレセニリン-1 遺伝子及び、又は変異プレセニリン-2 遺伝子が相同組換えにより導入された上記遺伝子変異動物；変異プレセニリン-1 遺伝子により引き起こされた脳組織でのアミロイド蛋白の発現量が、正常動物と比較して記憶学習試験において障害された行動を引き起こし、かつ当該動物の脳の海馬の大脳皮質周辺部において異常な神経病理を誘発するのに十分であることを特徴とする、上記遺伝子変異動物；並びに、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の1 又は2 以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子とマーカー蛋白をコードする塩基配列とを含むDNAを有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

さらに別の観点からは、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'（ただし、NはA、G、又はCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基は第213番のアミノ酸をコードする塩基である。）である変異プレセニリン-1 遺伝子を含むプラスミド；及びプレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子であって、第213番のアミノ酸の付近をコードするDNA配列が、次の配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCCC-3'（ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドン在意



味し、下線を付した塩基は第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)である遺伝子を含むプラスミドが提供される。プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAも提供される。

また、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のcDNA又は染色体DNAの全長又は変異部分を含む塩基配列に対してSau3AI部位が導入されたDNAを含むプラスミドが提供され、アミノ酸の置換が213番のイソロイシンからスレオニンへの置換である上記プラスミド；下記の塩基配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCC-3'（ここでMはT又はCを意味する。）で特定されるDNAを含むプラスミドが提供される。

これらに加えて、マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセニリン-1蛋白をコードする遺伝子；アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である上記遺伝子が提供される。また、(1)マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセニリン-1蛋白をコードする遺伝子、及び(2)loxPではさまれたネオマイシン発現ユニットを含むプラスミド；アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である上記プラスミドも提供される（loxPについては、すでに特表平4-501501号公報の第4頁に開示されている）。

さらに別の観点から、下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCC-3'（ここでMはT又はCを意味する。）で特定されるDNAを含むプラスミドが導入されたことを特徴とする胚；上記の各プラスミドを用いた相同組換えにより得られた胚；及び、哺乳類動物の齧歯類由来、好ましくはマウス由来の上記胚が提供される。また、上記の遺伝子



変異動物の細胞を単離し、組織培養により培養することにより得られる初代培養細胞又は継代培養細胞；並びに、変異プレセニリン-1 蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイド $\beta$  蛋白を生産させることができる変異プレセニリン-1 遺伝子を相同組換え法により動物の胚に導入する工程を含む、ヒト以外の遺伝子変異動物の作製方法；及び第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に変異した変異プレセニリン-1 変異蛋白を発現することができる上記方法が提供される。

また、被検化合物を投与した上記遺伝子変異動物と無投与の該動物との比較を行う工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質の評価方法が提供される。この評価方法の代表例としてスクリーニング方法を挙げることができる。この発明の好ましい態様によれば、記憶学習試験により比較を行う上記評価方法；病理試験により比較を行う上記評価方法；大脳皮質周辺部での神経病理に基づく病理試験により比較を行う上記評価方法；神経病理に基づく病理試験による比較が、当該脳の大脳皮質周辺部での肥大したグリオシスの減少の抑制、当該脳の大脳皮質周辺部での2-デオキシグルコース取り込みの減少の抑制、及び当該脳の大脳皮質での2-デオキシグルコース利用の減少の抑制からなる群から選択される1又は2以上の項目の比較である上記評価方法；並びに、当該動物の生存期間、探索行動、及び移動行動からなる群から選ばれる1又は2以上の項目について比較を行う上記評価方法が提供される。

さらに、上記初代培養細胞又は継代培養細胞を被検化合物の存在下でイン・ビトロ細胞培養する工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防剤の評価方法；OS-2型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子の部分塩基配列を用いることを特徴とする、アルツハイマー病又はアルツハイマー病の発症可能性の診断方法；上記の各評価方法により選択されたアルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質；並びに、上記物質を有効成分として含むアルツハイマー病の治療及び/又は予防剤が提供される。





また、上記の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパク（APP）の変異蛋白質をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの産生量の多い動物とを掛け合わせるにより作製したハイブリッド動物およびその子孫であって、好ましくは、掛け合わせにより作製した、又は掛け合わせにより生まれたハイブリッドマウスおよびその子孫であって、変異プレセニリン遺伝子とアミロイド前駆体タンパクの変異蛋白質をコードする遺伝子を有する遺伝子変異動物が提供される。この発明の好ましい態様では、APPの変異蛋白質をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ の産生量の多い動物が、PS1変異マウスである上記遺伝子変異動物が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、マウス・ジェノミックDNAライブラリーよりクローニングして得たマウスプレセニリン-1のエキソン8を含む染色体DNA断片P $\alpha$ の制限酵素地図である。

第2図は、部位特異的変異導入法によりOS-2型変異が導入された部位を含むマウスプレセニリン-1遺伝子のエキソン8の一部を持つプラスミドpmX-1の作製方法の工程を示した図である。

第3図は、ターゲティングベクターの作製の工程を示した図である。

第4図は、ターゲティングベクターの作製の工程を示した図である。

第5図は、ターゲティングベクターの作製の工程を示した図である。

第6図は、ターゲティングベクターの作製の工程を示した図である。

第7図は、ターゲティングベクターの作製の工程と、ターゲティングベクター-pOS-2neoIoxPの構造を示した図である。

第8図は、OS-2型変異プレセニリン-1遺伝子をもつ#2マウス（雄）とCAG-cre #13マウスのF4（雌）を交配して得られた仔の尾の一部を切断した試料から得られた染色体DNAを、例10に記載した方法でPCRを行った産物の1%アガロースゲル電気泳動の結果を示した図である。右側から2番目と4番



目のマウスは染色体DNA上に neo 発現ユニットをもっていないことが示されている。図中、最左端のレーンは分子量マーカーである。[A] は、染色体DNA上の neo を欠損していることをバンドであり、[B] は染色体DNAが野生型であることを示すバンドであり、[C] は染色体DNA上の neo 存在していることを示すバンドである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子変異動物の作製に用いられる変異プレセニリン遺伝子（本明細書において「変異プレセニリン遺伝子」という場合には、変異プレセニリンー1遺伝子及び変異プレセニリンー2遺伝子のいずれか片方又は両者を意味する）は、変異プレセニリン蛋白（本明細書において「変異プレセニリン蛋白」という場合には、変異プレセニリンー1蛋白及び変異プレセニリンー2蛋白のいずれか片方、又は両者を意味する）をコードする遺伝子である。この変異プレセニリン遺伝子はアミロイド $\beta$ 蛋白の生産量を増加させる性質を有している。本発明の遺伝子変異動物は、上記の変異プレセニリン遺伝子が、例えば相同組換え法により導入された哺乳類動物である。変異プレセニリン蛋白に存在する変異は、好ましくはアミノ酸残基の置換により生じたものであり、その変異の個数は制限されないが、好ましくは1個である。

哺乳類動物由来のプレセニリンー1蛋白の全長は、例えば E. Levy-Lahad, et al., Science, 269, pp. 973-977, 1995 に記載されている。ヒト及びマウス由来のプレセニリンー1蛋白の全長及び該蛋白をコードするDNA の一例をそれぞれ配列表の配列番号1～4に示した。例えばマウス由来のプレセニリンー1蛋白においては、変異部位は、第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第231番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第41



0番、第426番、及び第436番から選ばれる1又は2個所以上であることが好ましい。

より好ましい変異は、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、より好ましくはマウス由来のプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436Sからなる群から選ばれる1又は2以上の変異である。これらの変異のうち、第213番のアミノ酸が他のアミノ酸へ置換する変異（本明細書において「OS-2型変異」という場合がある。）は特に好ましい変異であり、例えば、第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異、又は第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異が特に好適である。

哺乳類動物由来のプレセニリン-2蛋白の全長は、例えば Science, 269, pp. 973-977, 1995 に記載されている。変異部位としては、第141番及び/又は436番が好ましく、マウス由来の配列においてはN141I及び/又はM239Vがより好ましい。プレセニリン-1蛋白及びプレセニリン蛋白-2のいずれか片方、又は両者に変異が存在していてもよい。

本発明の遺伝子変異動物は、その染色体DNA上に上記の変異プレセニリン-1遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2遺伝子を有することを特徴としている。本発明の遺伝子変異動物は哺乳類動物であればよく、その種類は特に限定されないが、例えば、ゲッ歯類動物を好適に用いることができる。特に好ましいのはマウスである。本発明の遺伝子変異動物は、変異プレセニリン遺伝子を含む約10 k b p程度の配列を有するDNAを用いてプラスミドを作製し、そのプラスミド



を胚性幹細胞に導入することにより、細胞内で相同組えを起こさせることにより作製することができる。

本発明の遺伝子変異動物は、上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2 遺伝子が相同組換えにより導入された結果、アミノ酸変異がほとんどの場合1 個所で起こるという特徴がある。いわゆるトランスジェニック動物の場合には、変異部分のDNA 配列がランダムに染色体DNA 上に挿入され、多くの場合、繰り返し配列の数十コピーが複数箇所に挿入されている。本発明の遺伝子変異動物ではこのような問題が回避されており、アルツハイマー病の病態を遺伝子レベルで正確に解析することが可能である。もっとも、本発明の遺伝子変異動物においてマーカー等を含むDNA を導入した場合は、そのマーカー部分及びマーカーを挿入するための配列などを含む場合もある。例えば、Sau3AI で切断可能な部位を挿入するために1 塩基を置換することができ、PCR 産物をSau3AI で切断して電気泳動等で確認することができる。

本発明の遺伝子変異動物は、その遺伝子変異の結果、正常動物に比べて $\beta$  アミロイド蛋白をより多量に生産するという特徴を有している。本発明の遺伝子変異動物により達成されるアミロイド $\beta$  蛋白の増加量は特に限定されないが、例えば、記憶障害、病理所見、各種の神経障害の程度を評価した場合に正常動物との間で実質的な差異が認められる程度であることが好ましい。

本発明により提供されるDNA、プラスミド、培養細胞、及び哺乳類動物細胞の胚も同様に上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2 遺伝子を有することにより特徴づけられる。例えば、変異プレセニリン-1 蛋白、好ましくはOS-2 型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のcDNA 若しくは染色体DNA の全長又は変異部分を含むDNA 配列；上記cDNA 若しくは染色体DNA の全長又は変異部分を含むDNA 配列にSau3AI 部位を導入したDNA を含むプラスミド；OS-2 型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8 を含む染色体DNA はいずれも本発明の範囲に包含される。また、これらの遺伝子又はDN





Aにおいて1又は2個以上、好ましくは1個ないし20個、より好ましくは1個ないし数個の塩基が置換したものも本発明の範囲に包含される。

本発明のDNA又はプラスミドの例としては、例えば、

1) プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子からなるDNA、及び該DNAを含むプラスミド；

2) 変異プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番付近のアミノ酸をコードするDNA塩基配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAT M GCCA N CCACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味する。)である変異プレセニリン-1遺伝子からなるDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

3) OS-2型変異変異プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番付近のアミノ酸をコードするDNA塩基配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAT M GCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味する。)である変異プレセニリン-1遺伝子からなるDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

4) Sau3AI 制限部位が導入された前記1)～4)のいずれかに記載のDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

5) プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換された変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1の遺伝子のcDNA若しくは染色体DNAの全長又は変異部分を含んだ配列にSau3AI 制限部位が導入されたDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

6) OS-2型変異マウスプレセニリン-1蛋白をコードする変異マウスプレセニリン-1遺伝子のエクソン8と、loxP ではさまれたネオマイシン (neomycin) 発現ユニットとを含むDNA、又は該DNAを含むプラスミド；並びに

7) プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがスレオニ



ンに置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 と、loxP ではさまれたネオマイシン (neomycin) 発現ユニットとを含む DNA、又は該 DNA を含むプラスミドなどを挙げるができるが、本発明の範囲はこれらの具体例に限定されることはない。

本発明により提供される胚又は細胞としては、上記のプラスミド、例えば PRL-104 又は PRL-105 の塩基配列を有するプラスミドを挿入した胚又は細胞を挙げるができる。また、前記のプラスミドを用いた相同組換えにより、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列の第 213 番に変異を含む変異プレセニリン-1 蛋白をコードする遺伝子を導入した細胞は、本発明の好ましい細胞である。胚又は細胞は哺乳類動物由来であればその種類は特に限定されないが、ゲッ歯類動物由来、好ましくはマウス由来の胚又は細胞を用いることができる。

#### [遺伝子変異動物の作製]

ヒト変異プレセニリンをコードする DNA を入手した後に、本発明のプレセニリン遺伝子変異動物を以下に述べる工程に従って作製することができる。以下、哺乳類動物としてマウスを用い、ヒト変異プレセニリン遺伝子としてヒト・変異プレセニリン-1 遺伝子を用いる例について説明するが、本発明の遺伝子変異動物はこれらを用いて作製されるものに限定されることはない。また、この方法は本発明の遺伝子変異動物の作製方法の一例であり、本発明の遺伝子変異動物の作製方法は以下の方法に限定されることはない。ここに記載された一般的な方法及び実施例に記載された具体的な方法を参照することにより、また必要に応じてこれらの方法に適宜の修飾ないし改変を加えることにより、当業者は本発明の遺伝子変異動物を容易に作製することができる。

まず、PCR 法で用いるプローブを作製するために、マウス・ジェノミク DNA ライブラリーから、作製しようとする変異動物のプレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 中の変異させる部位を含む DNA 断片を得る。マウス・ジェノミク



クDNAライブラリーとしては、実施例で述べる 129 系統のマウスジェノミックDNAのほか、いかなる系統のマウスのジェノミックDNAライブラリーを用いてもよい。変異を導入しようとする動物としてマウスを用いる場合には、マウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を用いるが、他の種類の動物においては適宜の部分を選択する必要がある。

つぎに、上記工程で作製したDNA断片をランダムプライミングでラベル化(<sup>32</sup>P)した後、ラベル化したプローブを用いてジェノミックライブラリーをスクリーニングし、プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA断片をクローニングする。さらに、クローニングしたプレセニリン-1 遺伝子のエキソン8中の変異させる部分をサブクローニングした後に変異を導入する。

変異を導入したマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAを含むターゲッティングベクターを作製する。ターゲッティングベクターには、選択マーカーとして neo 発現ユニットを導入しておき、G418 (抗生物質) を培地に添加することにより、ベクターが染色体に導入されなかった細胞を死滅させるようにしておく。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法や遺伝子を細胞内に導入する他の方法によってES細胞に導入した後、G418 存在下でES細胞を培養し、出現してくるコロニーを採取する。得られたコロニーを二つに分け、一つは培養・継代あるいは凍結により保存しておき、他の一つを使用して相同組換えにより目的とするマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8の変異が導入されたES細胞を調べる。目的とする変異が導入されたES細胞のコロニーの保存してある分を取り出して以下の工程に用いる。

別途、妊娠マウスから8細胞期胚を取り出し、上記の保存してあった約20個位のES細胞をまぶした後、偽妊娠させたメスマウスの子宮に導入する。生まれてきた仔の中から毛色がキメラのマウスを選択する。キメラマウスをC57Bl/6 系統と交配させ、生まれてきた仔の中から毛色がアグチのものを選択することにより、目的とする変異の入ったマウスを取得することかできる。なお、このマウスは変異の入ったプレセニリン-1 遺伝子に関してはヘテロであり、もう1本の染



色体にあるプレセニリン-1 遺伝子は変異のない野生型である。

マウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAをマウス・ジェノミックDNAライブラリーからクローニングするためのプローブを作製するための出発材料としては、実施例に具体的に述べる方法のほか、塩基配列が明らかにされているマウスやヒト等の他の哺乳類動物由来のプレセニリン-1 遺伝子のcDNAを用いてもよい。プローブとなるDNA断片を得る方法としては、実施例に述べるPCR法による増幅法のほか、染色体DNAのマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8に対応する部分を含むマウス染色体DNA、又は塩基配列が明らかにされているマウスやヒト等の他の哺乳類動物由来のプレセニリン-1 遺伝子のcDNAを含むプラスミドを大量に調製する方法などを採用することができる。また、このプラスミドを制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動等の手段を用いてDNA断片として必要な部分を分取することによっても目的のDNA断片を得ることができる。

DNA断片をラベル化する方法としては、実施例に述べるランダムプライミング法のほか、<sup>32</sup>P-dNTP 存在下にPCRを行う方法などを用いることができる。また、予めラベルしたオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして使用することにより、PCR法あるいはランダムプライミング法でラベル化してもよい。ラベル化には、実施例に示すラジオアイソトープのほか、ビオチン-アビジン (Biotin-Avidin)系あるいはアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase) 等を用いる化学発光法も利用できる。また、T3 又は T7 RNAポリメラーゼを用いてラベルしたRNA断片をプローブとして使用できる。この他、プローブを作製する方法は種々知られておりが、いかなる方法を採用して目的とするプローブを取得してもよい。

目的とする変異をDNAに導入する方法としては、実施例に具体的に示した方法のほか、M13 等のファージ由来のプラスミド又は ung<sup>-</sup> 大腸菌を用いて複製したプラスミドを用いて、目的の変異を導入したい部分に変異を導入するために合成したオリゴデオキシヌクレオチドを相補的に (変異導入部位の塩基のみは相補





的ではない) 結合させ、これをプライマーとしてDNAポリメラーゼでヘテロな二本鎖DNAプラスミドを作製し、このプラスミドで大腸菌(ung<sup>r</sup>) を形質転換することにより目的の変異を持ったプラスミドを取得することができる。また、目的とする変異を導入するために塩基を変更してあり、かつ互いに相補的にアニールすることができ、両端に制限酵素部位が生じるように設計された二本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、変異を導入すべきプラスミドにDNAリガーゼを用いて結合させる方法(カセット法)を採用して、目的の変異を持ったプラスミドを取得することもできる。これらの方法を目的に応じて適宜修飾ないし改良することにより、一層効率的に目的を達成できる場合がある。これらの他、変異を導入する方法は当業界で利用可能な種々の変異導入法が知られており、いずれの方法によっても目的を達成できる。

ターゲッティングベクターは、変異を導入したマウス染色体DNA断片、選択マーカーをコードするDNA断片、これの転写を制御するためのプロモーター、及びターミネーターを含む選択マーカー発現ユニットを必須要素として含んでいることが好ましい。変異を導入したマウス染色体DNA断片は、ES細胞内で相同組換えを起こすために必要な部分であり、変異を導入した箇所を挟んで前後のマウス染色体DNA断片が必要である。すなわち、ターゲッティングベクターは、変異させた塩基のみが本来のマウス染色体DNAとは異なるDNA断片を持っている。その断片の長さは10 kbp程度が好ましいが、一般的には多少の長さの増減は許容される。もっとも、あまりに短い場合には、ES細胞内での相同組換えの頻度が低下する場合がある。

選択マーカーとしては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等のポジティブ選択マーカー、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素Aフラグメント等のネガティブ選択マーカーなどが知られており、培養細胞株の選択マーカーとして使用されている選択マーカーはES細胞において何れも使用することができる。ネガティブ選択マーカーを使用する場合は、ターゲッティングベクターのマウス染色体DNA断片の外に挿入することが



必要であり、ポジティブ選択マーカを使用する場合は、その発現ユニットをターゲットイングベクターのマウス染色体DNA断片の中のイントロン中に挿入することが必要である。ポジティブ選択マーカをエキソン中に挿入すると、挿入された遺伝子は機能を失うのが通常であり、最終目的である変異の影響を調べるために作製するマウスを得ることができない場合がある。

ES細胞株としては129系統のマウス由来の株が多く使用されているが、この系統のES細胞としては、実施例で述べるR1のほか、D3、CCE、J1、AB1などのES細胞を用いてもよい。また、例えばC57BL/6系統のマウス等、129系統以外のマウス由来のES細胞も使用できる。ES細胞にターゲットイングベクターを導入する方法としては、実施例で述べるエレクトロポレーション法が一般的であるが、リン酸カルシウム共沈法やリポソーム法など、培養細胞株へのプラスミド導入に利用可能な方法であれば何れの方法を採用してもよい。ターゲットイングベクター導入後のES細胞を選択マーカ存在下で培養すると、生き残ってコロニーを形成するES細胞は相同組換えを起こしている可能性がある。これらのコロニーを形成したES細胞の中から相同組換えを起こしている細胞を調べる方法として一般的にはPCR法が用いられるが、プローブとして使用できるDNA断片、RNA断片、合成オリゴデオキシヌクレオチド、又は抗体などを使用することも可能である。

ES細胞を発生初期の受精卵に混入させた後、発生を継続させ、精子あるいは卵子がES細胞由来のマウスを得ることができる。相同組換えを起こしたES細胞を発生初期の受精卵に混入させる方法としては、実施例に述べる方法のほか、胎胚期の受精卵を妊娠マウスより取り出し、これに注入用ピペットで10~20個のES細胞を注入した後、偽妊娠させたメスマウスの子宮に移植することにより発生を継続させて仔を得る方法などを採用することができる。

ES細胞を混入させる際に使用する発生初期の受精卵はいずれの系統のマウスから採取したものでもよいが、混入させたES細胞が生まれた仔に取り込まれているかどうか分かりやすいように、ES細胞の元になっている系統のマウスとは



毛色の異なる系統のマウスの受精卵を使用するのが好ましい。例えば、実施例において使用したES細胞はアグチ色 (agouti 色、淡褐色) の 129 系統であり、受精卵が由来するマウス (C57BL/6 系統) は黒色の系統である。これらを用いて生まれてきた仔の中からキメラの毛色をしている仔を選択することにより、ES細胞由来の細胞を持っている仔を容易に選択することが可能である。この場合、アグチ色の割合の多い仔ほど生殖細胞がES細胞由来となっている可能性が高い。なお、偽妊娠させるマウスはどの系統のマウスでもよい。

得られたキメラマウスを交配させて目的とする変異導入マウスを取得するために使用するマウスも、ES細胞の元になっている系統のマウスとは毛色の異なる系統のマウスを使用するのが好ましい。通常、キメラマウスのオスと他系統のメスを交配させ、アグチ色の仔を得ればそれが目的とする変異をヘテロの状態で持っているマウスである。OS-2型変異のプレセニリン-1 遺伝子を持つマウスは、lox P 配列で挟まれた neo 発現ユニットを有しているため、cre 遺伝子導入トランスジェニックマウスとの交配により neo 発現ユニットが取り除かれたマウスを得ることができる。

本明細書の従来技術で述べたように、プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異は、A $\beta$ 42 の増加により老人斑の形成を促進し、アルツハイマー病を発症させると考えられる。一方、家族性アルツハイマー病の原因であるAPPの突然変異体をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおいて、脳内にアミロイド沈着を生じるマウスが報告されている (Games D. 等 : Nature 373 巻、523 頁、1995 年。Hsiao K. 等 : Science 274 巻、99 頁、1996 年。Sturchler-Pierrat C. 等 : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94 巻、24 号、13287 頁、1997 年)。これらのトランスジェニックマウスでは、脳内でのA $\beta$ の産生量が増加しているためにアミロイド沈着が生じていると考えられている。

APPの突然変異体をコードする遺伝子が導入され、脳内にアミロイド沈着を生じるトランスジェニック動物(導入遺伝子に関してホモであってもヘテロであってもよい)と、本発明のPS1 遺伝子変異動物(変異遺伝子に関してホモであっ



てもヘテロであってもよい)とを交配することにより、ハイブリッド動物を作製することができる。動物としてはマウスが好ましい。交配に際して、どちらの側の動物がオスであってもよい。

得られる仔の尾の一部を採取し、染色体DNAを抽出する。抽出した染色体DNAを基質として、APPの突然変異体をコードする遺伝子の突然変異部位を挟むように設計した塩基配列を持つ二本のオリゴデオキシヌクレオチドおよび変異PS1遺伝子の突然変異部位を挟むように設計した塩基配列を持つ二本のオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行う。

PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無、バンドのゲル上での易動度、突然変異部位を含む塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドを用いたハイブリダーゼーションによる突然変異を含むバンドの確認等により、抽出した染色体DNAに、APPの突然変異体をコードする遺伝子および本発明の突然変異PS1遺伝子が含まれているかどうかを調べることができる。PCRは実施例の例8に記載した方法に準じて行うことができる。PCRのプライマーに使用するオリゴヌクレオチドの塩基配列は、APPの突然変異体をコードする遺伝子あるいは突然変異PS1遺伝子を検出できるものであればいかなるものでもよい。PCRの結果に基づいて、APPの突然変異体をコードする遺伝子を有し、かつ、本発明の突然変異PS1遺伝子を持つ動物を選抜することにより、両遺伝子をそれぞれヘテロで持つ動物を得ることができる。

APPの突然変異体をコードする遺伝子および本発明の突然変異プレセニリン-1遺伝子の両遺伝子をホモで持つ動物を得るためには、この両遺伝子をそれぞれヘテロで持つ動物のうち、適当なオスおよびメスを選んで交配することにより得られる仔の中から、両遺伝子をホモで持つ個体を選択すればよい。APPの突然変異体をコードする遺伝子をホモで持つことを確認するためには、仔の尾の一部を採取し、染色体DNAを抽出し、抽出した染色体DNAを制限酵素で切断した後、アガロースゲル又はアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行なう。その後、メンブリンフィルターにDNAをブロッティングした後、APPの突然変異体をコ





ードする遺伝子と特異的に結合できる塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドをプローブとしてサザンブロッティングを行い、得られるバンドの濃さを測定すればよい。

この方法に準じて本発明の変異プレセニリン-1 遺伝子をホモで持つことを確認することができる。サザンブロッティングにプローブとして用いるオリゴデオキシヌクレオチドは、放射性同位元素、蛍光色素等サザンブロッティングに通常使用される手段により標識して用いることが可能である。このようにして、APPの突然変異体をコードする遺伝子および本発明の変異プレセニリン-1 遺伝子の両遺伝子を持つマウスを作製することができる。このような方法で作製したハイブリッドマウスは、脳内のアミロイド $\beta$  タンパクの生産がより多く、また、アミロイドの沈着が促進されているという特徴がある。

本発明の遺伝子変異動物、変異プレセニリン遺伝子を導入した細胞、変異プレセニリン遺伝子を含むプラスミド等を用いて、アルツハイマー病の予防及び又は治療に有用な物質をスクリーニングし、その有用性を評価することができる。健全な哺乳類動物ではアミロイド $\beta$ の蓄積は極めて徐々に生じるが、本発明の遺伝子変異動物は、アミロイド $\beta$ の産生が多いという特徴を有している。従って、本発明の遺伝子変異動物に種々の被検物質を投与し、非投与群の動物又は対照物質投与動物と比較することにより、アルツハイマー病の予防及び又は治療に有用な物質を評価することができる。評価の代表例として被検物質のスクリーニングを挙げることができ、試験項目としては、症状、病理所見、薬理試験等を採用することができる。

また、本発明の細胞を用いる場合には、本発明の動物から分離して初代培養細胞として用いることができるほか、その初代培養細胞をウイルス等で不死化した後、継代培養して数日毎に当該培養細胞の一部を取り出して再び新しい組織培養液で培養することにより、当該細胞を安定して継代培養細胞とすることができる。なお、本発明の細胞には、遺伝子変異動物から分離した神経細胞などの初代細胞のほか、初代細胞を継代培養していわゆるライン化された継代培養細胞も包含さ



れる。本発明の細胞として神経細胞を用いる場合には、細胞が変異プレセニリン-1 蛋白を発現する結果としてアミロイド $\beta$  蛋白が多量に発現される。このような神経細胞のインビトロの培養系に被検物質を添加した後、例えば細胞の生存期間や一定期間経過後の生細胞数などを比較することにより、アミロイド $\beta$  蛋白の蓄積が関与する神経細胞死を予防又は遅延させる物質をスクリーニングし、その有用性を評価することができる。

### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの例に限定されることはない。実施例中、プレセニリン-1 遺伝子をPS-1 と略する場合がある。

例1：マウス・プレセニリン-1 (PS1) 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAのクローニング

マウスPS1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA断片取得用のプローブ作製のため、まず下記の2本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。

PR-8-U：5'-GGAATTTTGGTGTGGTCGGGATGAT-3' (25mer)

PR-8-L：5'-GGTCCATTTCGGGGAGGTACTTGA-3' (23mer)

この2本のオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、129SVJマウスジェノミックライブラリー (Stratagene 社製) より抽出したDNAを用いてPCRを行い、得られた約130bpの増幅されたDNA断片を得た。この断片を $^{32}\text{P}$ -dCTP存在下、ランダムプライムラベル法によりラベルしたものをプローブとし、129SVJマウスジェノミックライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性ファージクローンの塩基配列を調べ、目的とするマウスPS-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAを持ったクローンであること確認した。このクローニングした染色体DNAをP $\alpha$ とし、その制限酵素地図を作製した (図1)。



例2：突然変異導入用プラスミドの作製：

P $\alpha$ を持つクローン化したファージよりDNAを抽出し、Sal I で切断後、1.0% アガロースゲル電気泳動を行い、P $\alpha$ を回収した。P $\alpha$ を Pst I および Xba I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、マウスPS1の第213番目のアミノ酸であるイソロイシンをコードしている塩基を含む約600bpのDNA断片を回収し、これをX-1とした。X-1を予めPst I および Xba I で切断したプラスミド pBluescript II KS+ (Stratagene 社製) とT4リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミドpX-1を得た。

例3：OS-2型突然変異の導入：

プラスミドpX-1に下記の2本のオリゴデオキシヌクレオチドPRL-104 およびPRL-105を用いて、OS-2型突然変異および制限酵素Sau3AI部位を新たに導入した。なお、PRL-104 および PRL-105は何れも36merで、互いに相補性となっている。

PRL-104 : 5'-TGTGGTCGGGA TGATC\* GCCA C CCACTGGAAAGGCCC-3'

PRL-105 : 5'-GGGCCTTTCCAGTGG G TGGCG\* ATCATCCCACCACA-3'

(下線を付した塩基はOS-2型変異導入のため本来の塩基を変異させてある：PRL-104では本来はT、PRL-105では本来はAである。また、アステリスクを付した塩基はSau3AI部位導入のため本来の塩基を変異させてある：PRL-104では本来はT、PRL-105では本来はAである)。

変異の導入はQUICK CHANGE SITE-DIRECTED MUTAGENESISKIT (Stragene 社製)を使用し、同社のプロトコールに従って実施した。塩基配列を調べて変異が正しく導入されていることを確認し、この変異を持ったX-1をmX-1とし、mX-1を持つプラスミドをp mX-1とした(図2)

例4：OS-2型変異を持った染色体DNAの作製

例1で得たマウスPS-1のエキソン8を含むP $\alpha$ をNco Iで切断後、4種類の



d N T P s 存在下、T 4 D N A ポリメラーゼで平滑末端とした。ついで、Asp718I で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン8を含む約5 kbp のD N A断片を回収した。このD N A断片を、予め Sma I および Asp718 I で切断したプラスミド pBluescript II KS+とT 4 D N Aリガーゼで結合し、大腸菌を形質転換してプラスミド pSB-0 を得た。pSB-0 を Xba I で完全に切断した後、Pst I で部分消化を行った。一方、pmX-1 を Xba I および Pst I で切断した後、1 %アガロースゲル電気泳動を行い mX-1 を回収した。上記の Pst I 断片に mX-1 をT 4 D N Aリガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、プラスミド pSB-0 の X-1 部分が mX-1 と置換されているプラスミドを持つコロニーを選択し、回収したプラスミドを pmSB-0 とした (図3)。

また、P  $\alpha$  を BamH I および Sal I で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行い、約7 kbp のエキソン8を含むD N A断片を回収した。予め Bam H I および Sal I で切断した pBluescript II KS+をこの断片にT 4 D N Aリガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pSB-1 を得た。pmSB-0 を Nco I で切断後、4種のd N T P s 存在下 T4D N A ポリメラーゼで平滑末端化し、更に XbaI で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行った。回収したエキソン8を含む約2.2 kbp のD N A断片X Nと pSB-1 を Xba I および Pst I で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行った。回収したエキソン8を含まない約2.3 kbp のD N A断片P XをT 4 D N Aリガーゼで結合させた。これを、予め Xba I で切断してから4種のd N T P s 存在下にT 4 D N Aポリメラーゼで平滑末端化した後、T 4 D N Aリガーゼで再結合させ、さらに Sma I および Pst I で切断したプラスミド pBluescript II KS+とT 4 D N Aリガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、D N A断片N XとX Pが Xba I 部位で結合したD N A断片を1個だけ含むプラスミド pmSB-0' を得た (図4)

例5：ターゲッティングベクターの基本骨格の作製

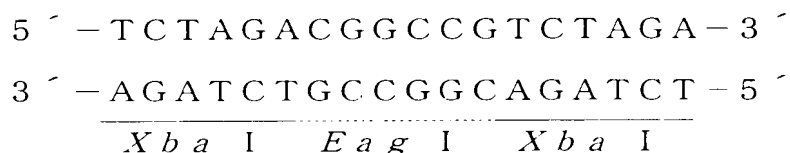




プラスミド pmSB-0' を Xba I 部位に Eag I 部位を導入するため次の塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。

5'-CTAGACGGCCGT-3' (12 mer)

このオリゴデオキシヌクレオチドは CGGCCG 部分の相補性を持つ塩基配列を介してアニールすることができ、Xba I で切断した部位に挿入すると以下のようになる。



プラスミド pmSB-0' を Xba I で切断後、このオリゴデオキシヌクレオチドを加え T4 DNA リガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換し、プラスミド pmSB-0' の Xba I 部位に Eag I 部位が挿入されたプラスミド pmSB-0' eag を得た。この pmSB-0' eag を Nco I および Sal I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン8を含む約 5.3 kbp の DNA 断片 SN を回収した。また、pSB-1 を BamHI および Nco I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン8を含まない約 2 kbp の DNA 断片 NB を回収した。SN および NB を T4 DNA リガーゼで結合させ、BamH I および Sal I で処理することにより、両 DNA 断片が Nco I 部位で結合した DNA 断片を得た。この DNA 断片を、予め、Not I で切断後マングベーンスクレアーゼ処理により平滑末端化し、T4 DNA リガーゼで再結合させることにより Not I 部位およびそれに重なっている Eag I 部位を壊し、さらに BamH I および Sal I で切断したプラスミド pBluescript II KS+ と T4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pA を得た (図5)。



#### 例6：ターゲッティングベクターの作製

プラスミド pPNT (Victor L. J. 等 : Cell 65 巻、1153 頁、1991 年) を Xho I および BamH I で切断後、T 4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化し、1 % アガロースゲル電気泳動を行った。回収した neo 発現ユニットを含む約 1.7 kbp の DNA 断片を、予め Bam H I で切断後、T 4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化したプラスミド pBS246 (ギブコ B R L 社製) に対して T 4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pBS246neo を得た。このプラスミドを Not I で切断後、1 % アガロースゲル電気泳動を行い、loxP 配列に挟まれた neo 発現ユニットを持つ約 2 kbp の DNA 断片を回収した。この DNA 断片を、予め EagI で切断した pA と T 4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、neo 遺伝子の方向が PS-1 遺伝子と同方向になっているプラスミド pB を得た (図 6)。

プラスミド pB を BamH I および Sal I で切断後、1 % アガロースゲル電気泳動を行い、OS-2 型変異を持ち、かつ loxP 配列に挟まれた neo 発現ユニットを持つ DNA 断片 C を回収した。また、P $\alpha$  を Sal I および BamH I で切断して得た約 6.5 kbp の DNA 断片を pBluescript II KS+へサブクローニングして得たプラスミド pSB-2 を、Hind III および BamH I で切断後、1 % アガロースゲル電気泳動を行い、約 4 kbp の DNA 断片 D を回収した。DNA 断片 C および D を T 4 DNA リガーゼを用いて結合した後、Hind III および Sal I で切断し、DNA 断片 C と D が Bam H I 部位で結合した DNA 断片を得た。この DNA 断片を、予め Hind III および Sal I で切断した pBluescript II KS+ と T 4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換し、ターゲッティングベクター pOS-2neo<sub>loxP</sub> を得た (図 7)。

#### 例7：ES細胞へのターゲッティングベクターの導入

以下の実施例で記載する細胞の培養は、全て 37°C の 5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中で行った。1.5 % FBS および 10<sup>3</sup> units/ml の LIF (ESGRO 社製) を添加



したDMEM培地（以下、ES用培地と略す）で維持しているES細胞R1に対して、エレクトロポレーション（electroporation）法によりターゲッティングバクターの導入を行った。エレクトロポレーションを実施する前日に新鮮なES用培地と交換したR1細胞を集め、エレクトロポレーション用溶液（20 mM HEPES, pH 7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6mM dextrose）で洗浄した。10<sup>7</sup> 個のR1細胞を、Not I で線状化した25 μg のターゲッティングバクター pOS-2neoloxP と 0.8 ml のエレクトロポレーション用溶液を用い、エレクトロポレーション用キュベット中で混合した。1～2分後、Bio-Rad GenePulser（バイオラッド社製）を使用してパルスを与えた（パルス条件：240V, 500 μF）。遠心分離によりES細胞を回収し、30 ml のES用培地に懸濁した。予め8 ml のES用培地中にフィーダー細胞を播いてある10 ml ディッシュ1枚当たりこのES細胞懸濁液2 ml を加え、12～18時間後に力価150 μg/ml のG418を添加して、1週間培養した。なお、フィーダー細胞としては、本発明者がHS1ノックアウトマウス（I. Taniuchi 等；EMBO J. 14 巻、3664 頁、1995 年）の雄と野性型のICR系統の雌を交配し、12～13日胚から分離して樹立した線維芽細胞を使用した。

#### 例8：相同組換えを起こしたES細胞の取得

例7において、G418の添加後1週間培養して生じてきたES細胞のコロニーを採取した。各コロニーを二分し、一つは培養を継続した。もう一つは相同組換えを起こしているクローンを選択するためPBSで洗浄し、Proteinase K 処理を行った後、染色体DNAを回収してPCRによりクローンを選択した。PCRにおいて用いた合成プライマーの塩基配列は次の通りである。

Prsn1-2 : 5'-CCCAACTCTATTTCTACCCTCGTTCATCTG-3'

（構築したターゲッティングバクターの外側に有る塩基配列）

PKG-1 : 5'-TAGTGAGACGTGCTACTTCCATTTGTCACG-3'

（neo 発現ユニット中の塩基配列）



PCR の実験条件は、93℃で 30 秒、60℃で 1 分、68℃で 3 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、PCR 産物の 1%アガロースゲル電気泳動を行い、予想される位置にバンドを生じたクローンを陽性と判断した。ここで陽性と判断されたクローンはオリゴデオキシヌクレオチド PRL-101 および PRL-102 を用いた PCRを行い、PCR 産物を Sau3AI で切断した後、2%アガロースゲル電気泳動を行い、バンドが二分されていることから変異が導入されていることを確認して正しく相同組換えを起こした ES 細胞を選択した。

PRL-101 および PRL-102 の塩基配列は次の通りである。

PRL-101 : 5'-TGCTGGAGGAAAATGTGTTATTTAAGAGCA-3'

PRL-102 : 5'-TACTGAAATCACAGCCAAGATGAGCCATGC-3'

#### 例 9 : ノックインマウスの取得 :

相同組換えを起こしていることが確認された ES 細胞の培養を 4 日間継続した後、細胞をトリプシン処理によりバラバラに分散した。マウス BDF1 系統の雄を掛け合わせた同系統の雌より 8 細胞期胚を取り出し、透明帯を外した後、バラバラにした上記 ES 細胞を接着させた (20 ES 細胞/8 細胞期胚 1 個)。これを偽妊娠処理した雌マウスの子宮に移し、胎児の発生を継続させることによりキメラマウスを得た。このキメラマウスの雄を C57BL/6 の雌と交配し、生まれた仔のうちアグチ色のものを選び、その尾の一部を切断した試料から染色体 DNA を抽出した。PRL-101 および PRL-102 を用いて PCR を行った後、Sau3AI で PCR 産物を切断し、2%アガロースゲル電気泳動を行い、切断されたバンドの存在を調べることにより OS-2 型変異を持っていることを確認した。確認されたマウスのうち雄を一匹選び #2 とした。

#### 例 10

例 9 で得られた ノックインマウス #2 はターゲッティングベクター由来の loxP で挟まれた neo 発現ユニットをヘテロの状態で有している。このマウス #





2 (雄性、約 4 ヶ月齢) を CAG-cre#13 (K. Sakai 等; Biochem. Biophys. Res. Commun. 217:318, 1997) トランスジェニックマウスの F 4 の雌 (2 ヶ月齢: 導入した cre 遺伝子はヘテロの状態となっている。) と交配し、例 8 で述べた条件でオリゴデオキシヌクロチド PRL-100, PRL-102 及び PGK-1 を用いて PCR を行い、neo 発現ユニットが除かれたマウスを選択することにより、neo 発現ユニットを持たない OS-2 型変異のノックインマウスを取得した (図 8)。本マウスは OS-2 型変異に関してヘテロであり、また、一つの loxP を保持している。なお、PCR に使用した PRL-100、PRL-102 及び PGK-1 の塩基配列は以下のとおりである。

PRL-100: 5'-GGT CCA TCC CAG CTT CAC ACA GAC AAG TCT-3'

PRL-102: 5'-TAC TGA AAT CAC AGC CAA GAT GAG CCA TGC-3'

PKG-1: 5'-TAG TGA GAC GTG CTA CTT CCA TTT GTC ACG-3'

#### 産業上の利用可能性

本発明の遺伝子変異動物は、変異プレセリニン-1 遺伝子を有するために、正常動物 (その変異を持たない動物) に比較してアミロイド  $\beta$  の生産量が多く、大脑海馬神経細胞死や脱落が早期に起こりアルツハイマー症状を呈する。従って、本発明の遺伝子変異動物を用いて、アルツハイマー病の予防及び/又は治療に有用な物質のスクリーニングなどを行うことができ、有用性の評価を行うことができる。



## 請求の範囲

1. 変異プレセニリン遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。  
2. プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有する請求の範囲第1項記載の遺伝子変異動物。

3. プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、次の番号：

第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第231番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番からなる群から選ばれる1又は2以上の箇所のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する変異プレセニリン-1 蛋白をコードするDNA配列を含むプレセニリン-1 変異遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

4. プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、

A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436S、

(各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1 蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。)

からなる群から選ばれる1又は2以上の変異を有する変異プレセニリン-1 蛋白



をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

5. プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

6. プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA塩基配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

7. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

8. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

9. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、XYZはイソロイシン以外のアミノ酸をコードする3塩基のコドンを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコ



ードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

10. プレセニリン-2蛋白のアミノ酸配列において、第141番及び「又は436番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

11. プレセニリン-2蛋白のアミノ酸配列において、N141I及び「又はM239V(各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-2蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。)の変異を有する変異プレセニリン-2蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2遺伝子を有する請求の範囲第10項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

12. アミロイドβ蛋白の過剰発現が変異プレセニリン-1遺伝子及び「又は変異プレセニリン-2遺伝子に起因するものである、請求の範囲第1項ないし第11項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物。

13. 変異プレセニリン蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が、哺乳類動物の脳の脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ蛋白を生産させるものである、請求の範囲第1項ないし第12項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

14. 遺伝子変異動物が哺乳類動物の齧歯類である請求の範囲第1項ないし第13項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

15. 遺伝子変異動物がマウスである請求の範囲第1項ないし第14項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

16. 変異プレセニリン-1遺伝子及び「又は変異プレセニリン-2遺伝子が相同組換えにより導入された請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

17. 変異プレセニリン-1遺伝子により引き起こされた脳組織でのアミロイド蛋白の発現量が、正常動物と比較して記憶学習試験において障害された行動を引





き起こし、かつ当該動物の脳の海馬の大脳皮質周辺部において異常な神経病理を誘発するのに十分であることを特徴とする、請求の範囲第1項ないし第16項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

18. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の1又は2以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子とマーカー蛋白をコードする塩基配列とを含むDNA配列を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

19. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはA、G、又はCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)である変異プレセニリン-1遺伝子のDNA配列又はその部分配列を含むプラスミド。

20. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子であって、第213番のアミノ酸の付近をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)である遺伝子のDNA配列又はその部分配列を含むプラスミド。

21. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA。

22. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のcDNA又は染色体DNAの全長又は変異部分を含む塩



基配列に対して Sau3AI 部位が導入されたDNAを含むプラスミド。

23. アミノ酸の置換が213番のイソロイシンからスレオニンへの置換である請求の範囲第22項に記載のプラスミド。

24. 下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAMCGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'

(ここでMはT又はCを意味する。)

で特定されるDNAを含むプラスミド。

25. マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセリニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む遺伝子。

26. アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である請求の範囲第25項に記載の遺伝子。

27. (1) マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセリニリン-1蛋白をコードする遺伝子、及び(2) loxP では含まれたネオマイシン発現ユニットを含むプラスミド。

28. アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である請求の範囲第27項に記載のプラスミド。

29. 下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'

(ここでMはT又はCを意味する。)

で特定されるDNAを含むプラスミドが導入されたことを特徴とする胚。

30. 請求の範囲第20項、第22項、第23項、第24項、第27項、又は第28項に記載のプラスミドを用いた相同組換えにより得られた胚。

31. 胚が哺乳類動物の齧歯類由来の胚である請求の範囲第29項又は第30項に記載の胚。

32. マウス由来の胚性幹細胞である請求の範囲第29項ないし第31項のいずれ



か1項に記載の胚。

33. 請求の範囲第1項ないし第18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物の細胞を単離し、組織培養により培養することにより得られる初代培養細胞又は継代培養細胞。

34. 変異プレセニリン-1蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が脳の海馬又は大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイド $\beta$ 蛋白を生産させることができる変異プレセニリン-1遺伝子を相同組換え法により動物の胚に導入する工程を含む、ヒト以外の遺伝子変異動物の作製方法。

35. 請求の範囲第34項に記載の遺伝子変異動物の作製方法において、第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に変異した変異プレセニリン-1変異蛋白を発現する方法。

36. 被検物質を投与した請求の範囲第1項ないし第18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と無投与又は対照物質を投与した該動物との比較を行う工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質の評価方法。

37. 記憶学習試験により比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

38. 病理試験により比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

39. 大脳皮質周辺部での神経病理に基づく病理試験により比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

40. 神経病理に基づく病理試験による比較が、当該脳の大脳皮質周辺部での肥大したグリオシスの減少の抑制、当該脳の大脳皮質周辺部での2-デオキシグルコース取り込みの減少の抑制、及び当該脳の大脳皮質での2-デオキシグルコース利用の減少の抑制からなる群から選択される1又は2以上の項目の比較である、請求の範囲第38項又は第39項に記載の評価方法。

41. 当該動物の生存期間、探索行動、及び移動行動からなる群から選ばれる1又は2以上の項目について比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

42. 請求の範囲第33項に記載の初代培養細胞又は継代培養細胞を被検化合物



の存在下でイン・ビトロ細胞培養する工程を含む、アルツハイマー病の治療及び／又は予防剤の評価方法。

43. OS-2型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子の部分塩基配列を用いることを特徴とする、アルツハイマー病又はアルツハイマー病の発症可能性の診断方法。

44. 請求の範囲第36項ないし第42項のいずれか1項に記載の評価方法により選択されたアルツハイマー病の治療及び／又は予防に有用な物質。

45. 請求の範囲第44項に記載の物質を有効成分として含むアルツハイマー病の治療剤及び／又は予防剤。

46. 請求の範囲第1項ないし第18項に記載の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多い動物とを掛け合わせるにより作製したハイブリッド動物およびその子孫であって変異プレセニリン遺伝子とアミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有する遺伝子変異動物。

47. 動物がマウスである請求の範囲第46項に記載の遺伝子変異動物。

48. アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多いマウスが、PS1変異したマウスである請求の範囲第47項に記載の遺伝子変異動物。

49. 請求の範囲第7項ないし18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多いマウスとを掛け合わせるにより作製したハイブリッドマウスおよびその子孫であって変異プレセニリン遺伝子とアミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有する遺伝子変異マウス。

50. 請求の範囲第7項ないし18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多いマウスとを掛け合わせるにより生まれたハイブリッドマウスおよびその子孫であって変異プレセニリン遺伝子とアミロイド





前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有する遺伝子変異マウス。

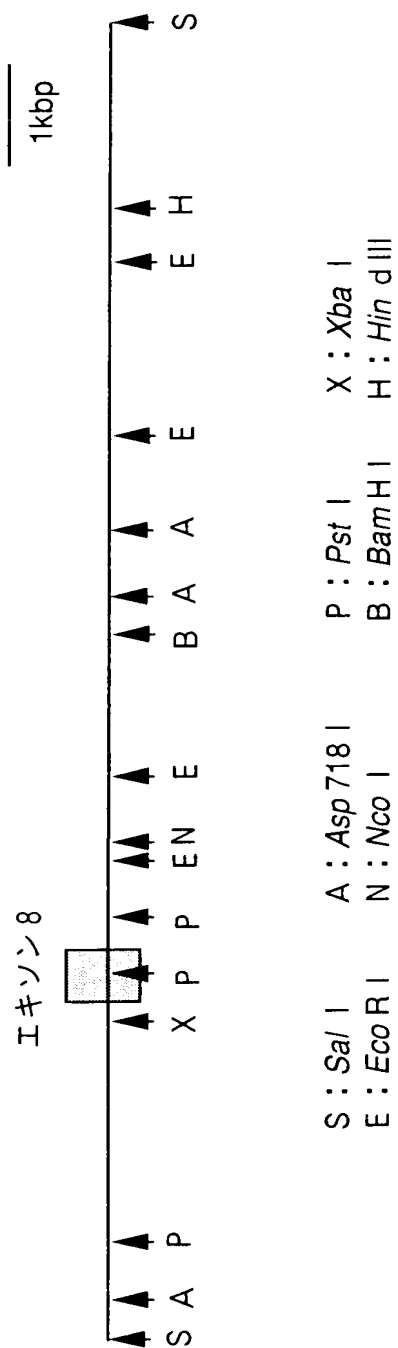


## 要 約 書

プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白（例えばマウス由来のプレセニリン-1 蛋白の第 213 番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸、例えばスレオニンに置換した変異プレセニリン-1 蛋白）をコードする DNA 配列をコードする DNA 配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有するマウスなどの遺伝子変異動物。ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物として有用である。

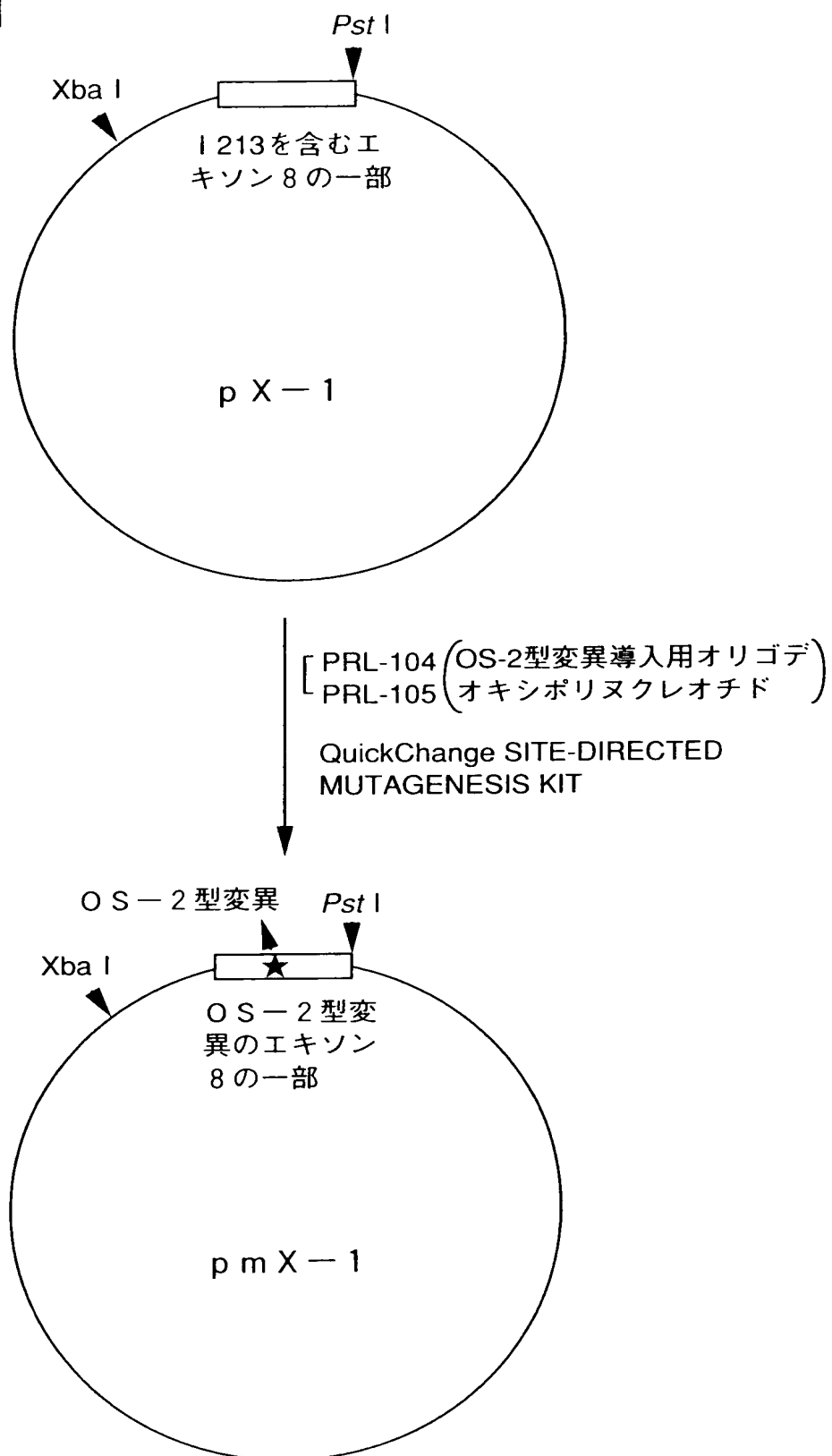


第 1 図





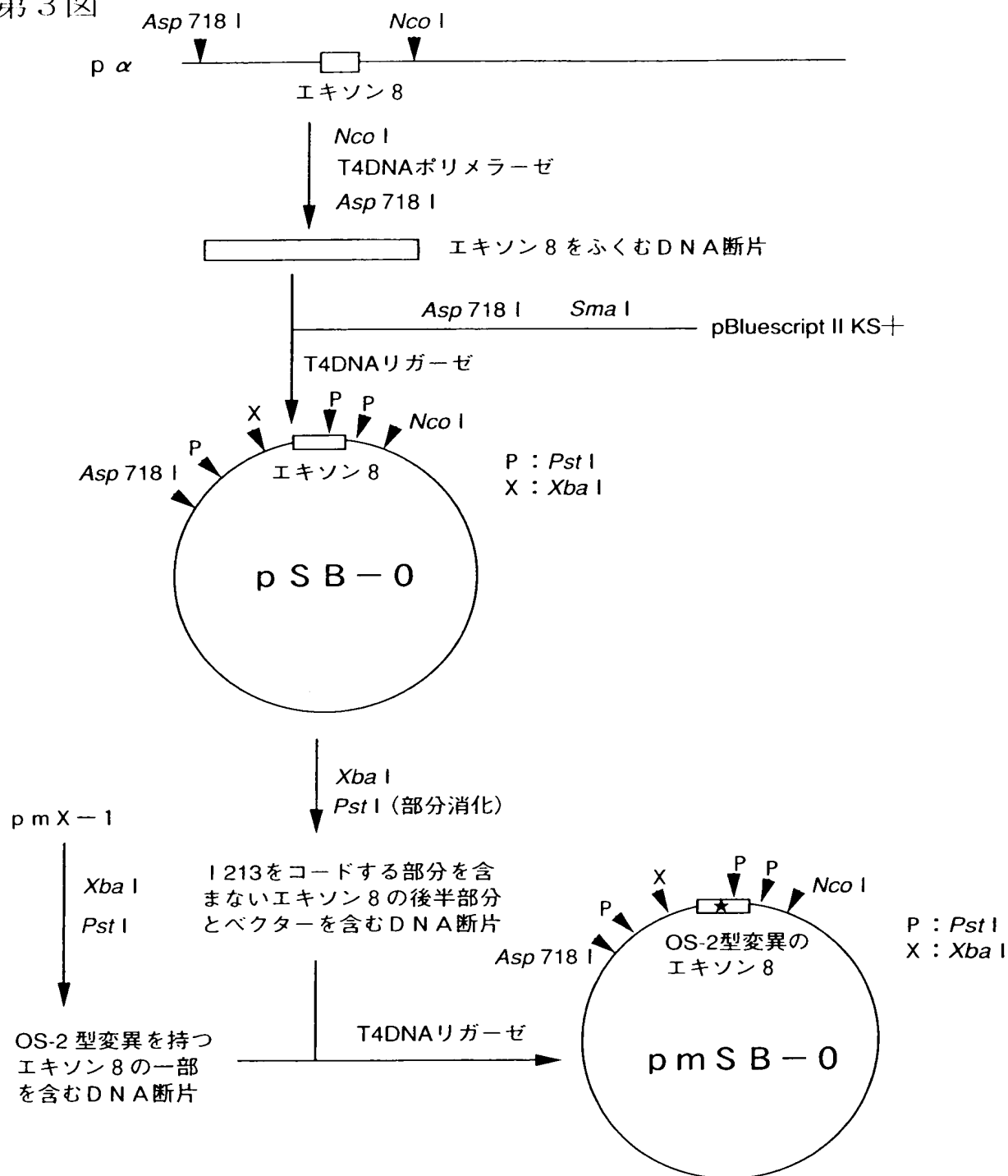
第2図





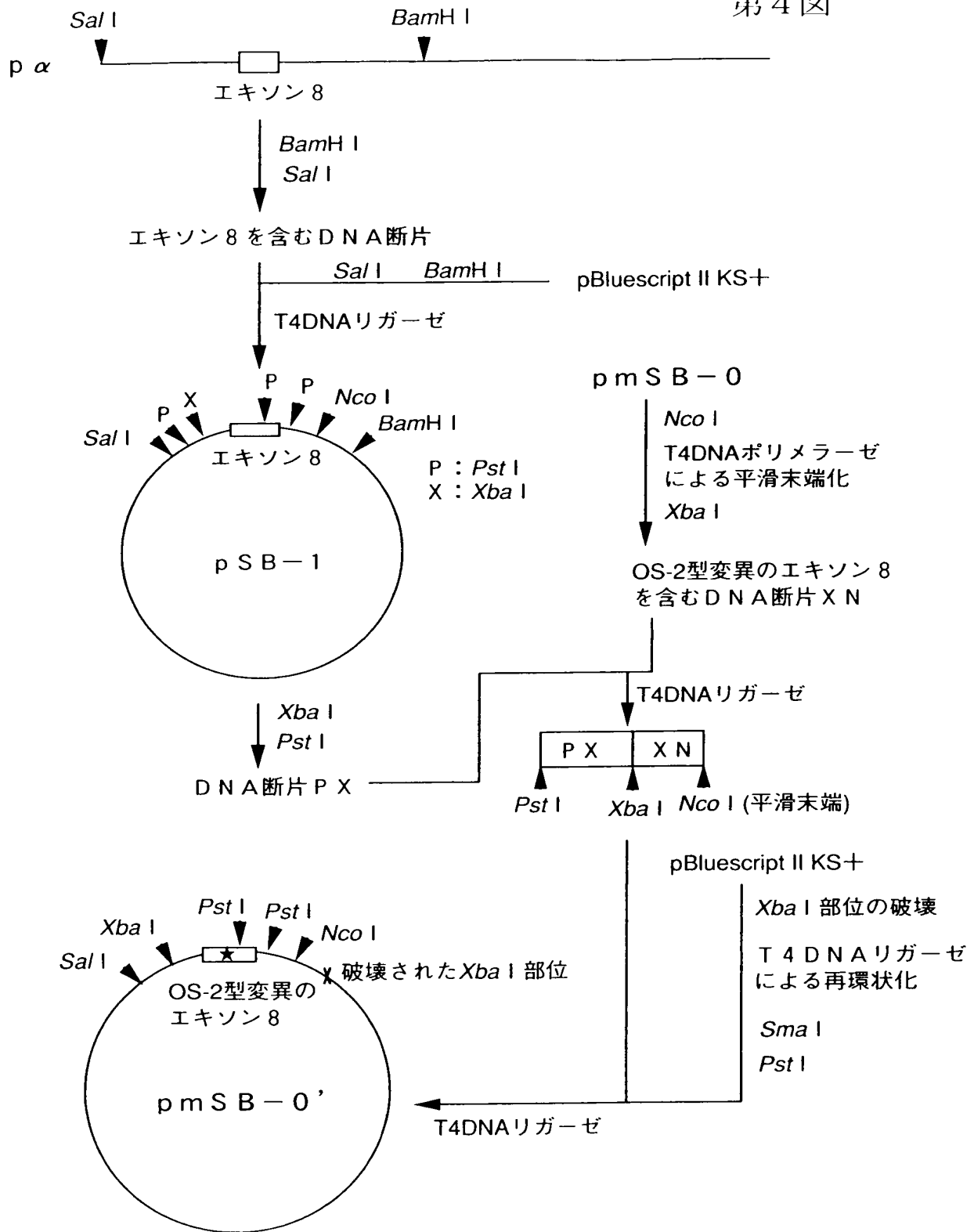


# 第3図



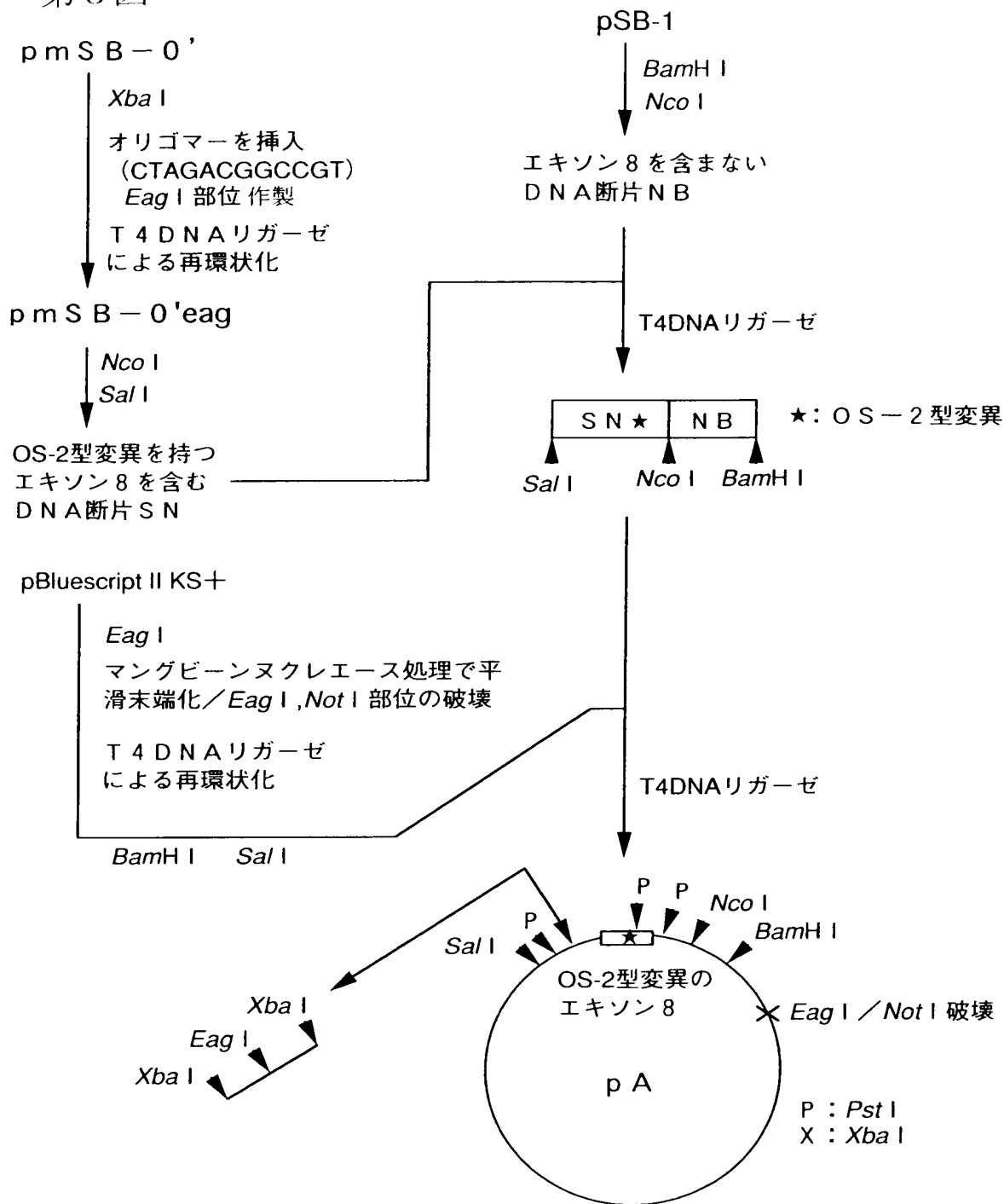


第4図



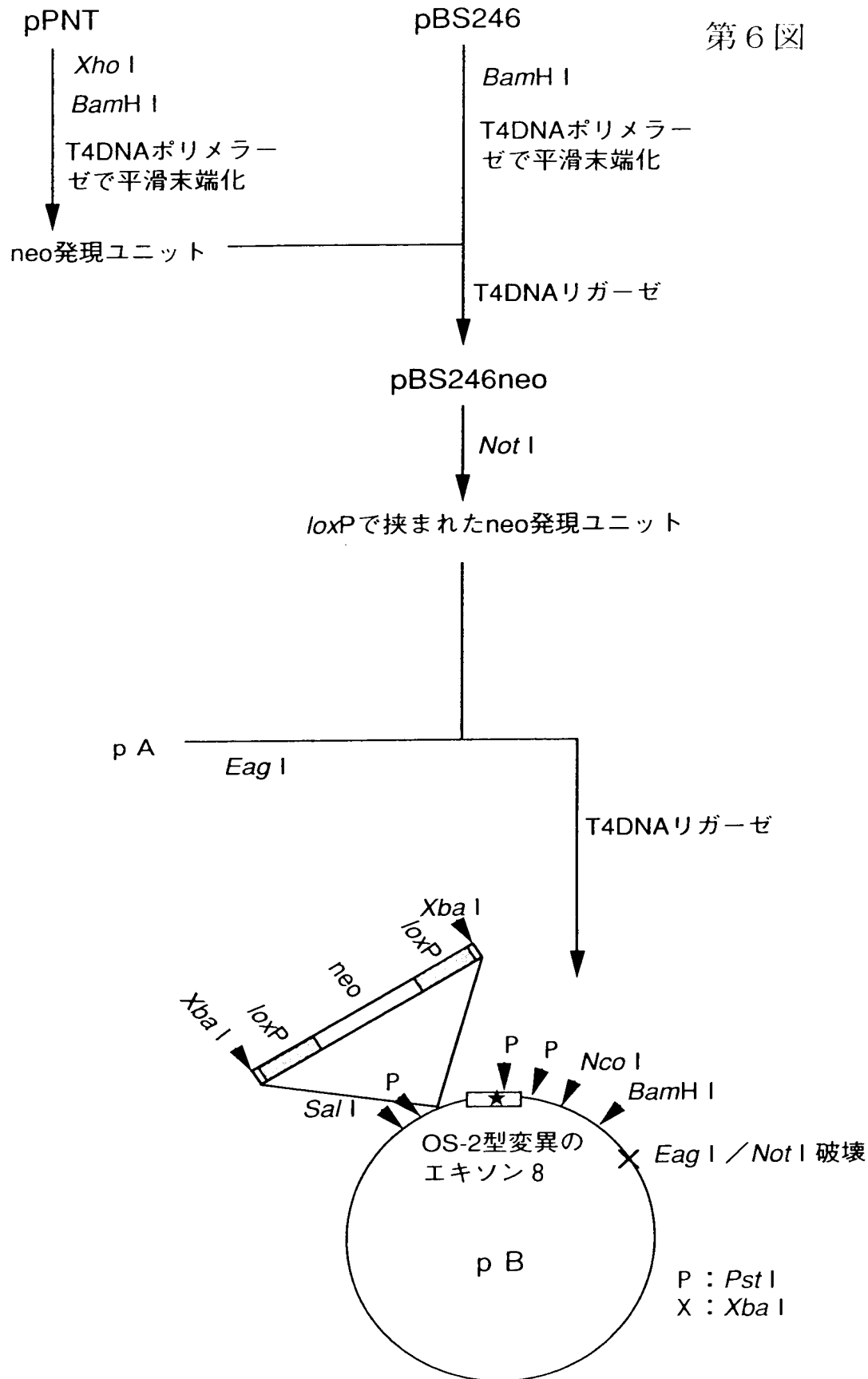


# 第5図





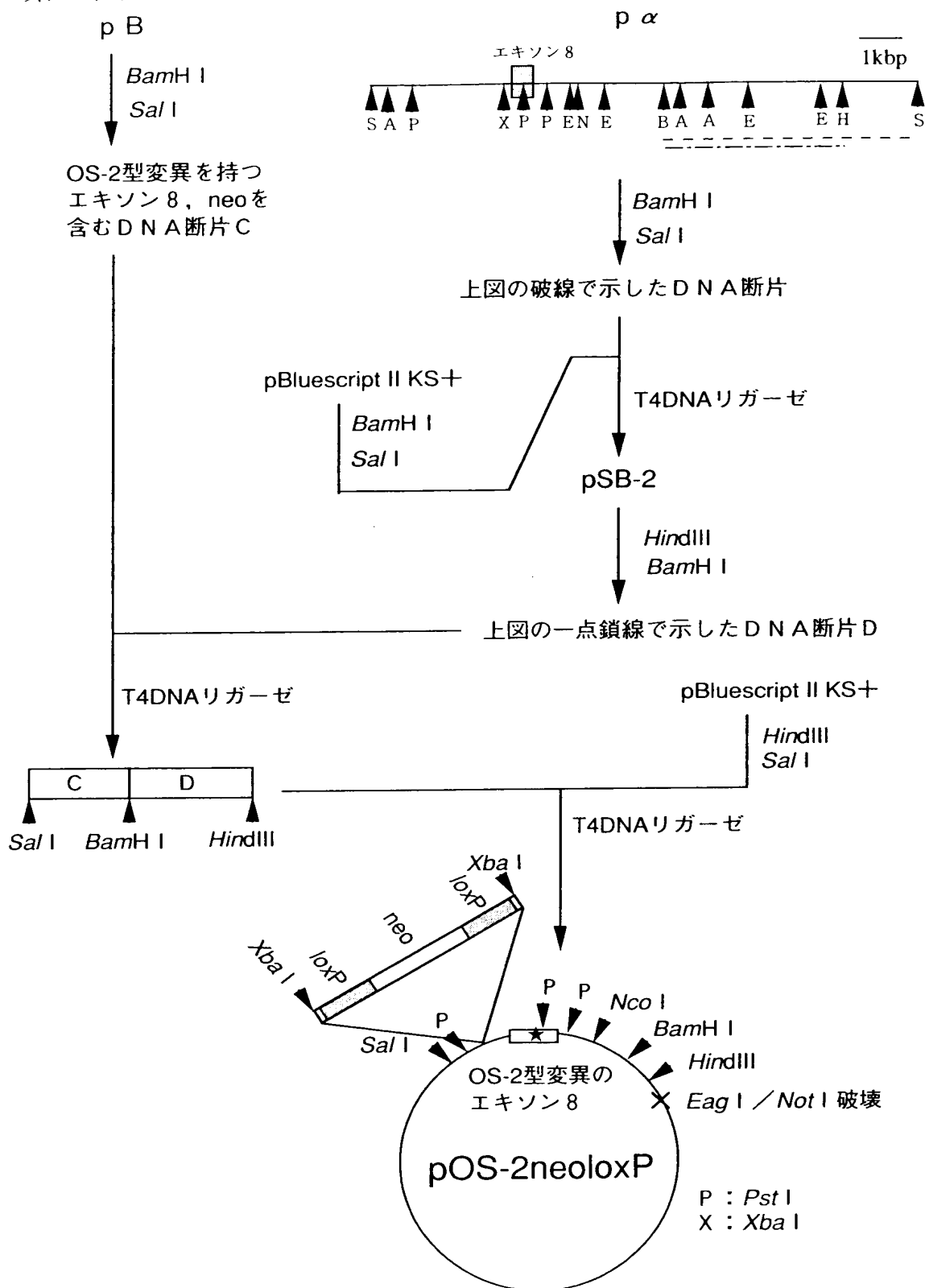
第6図





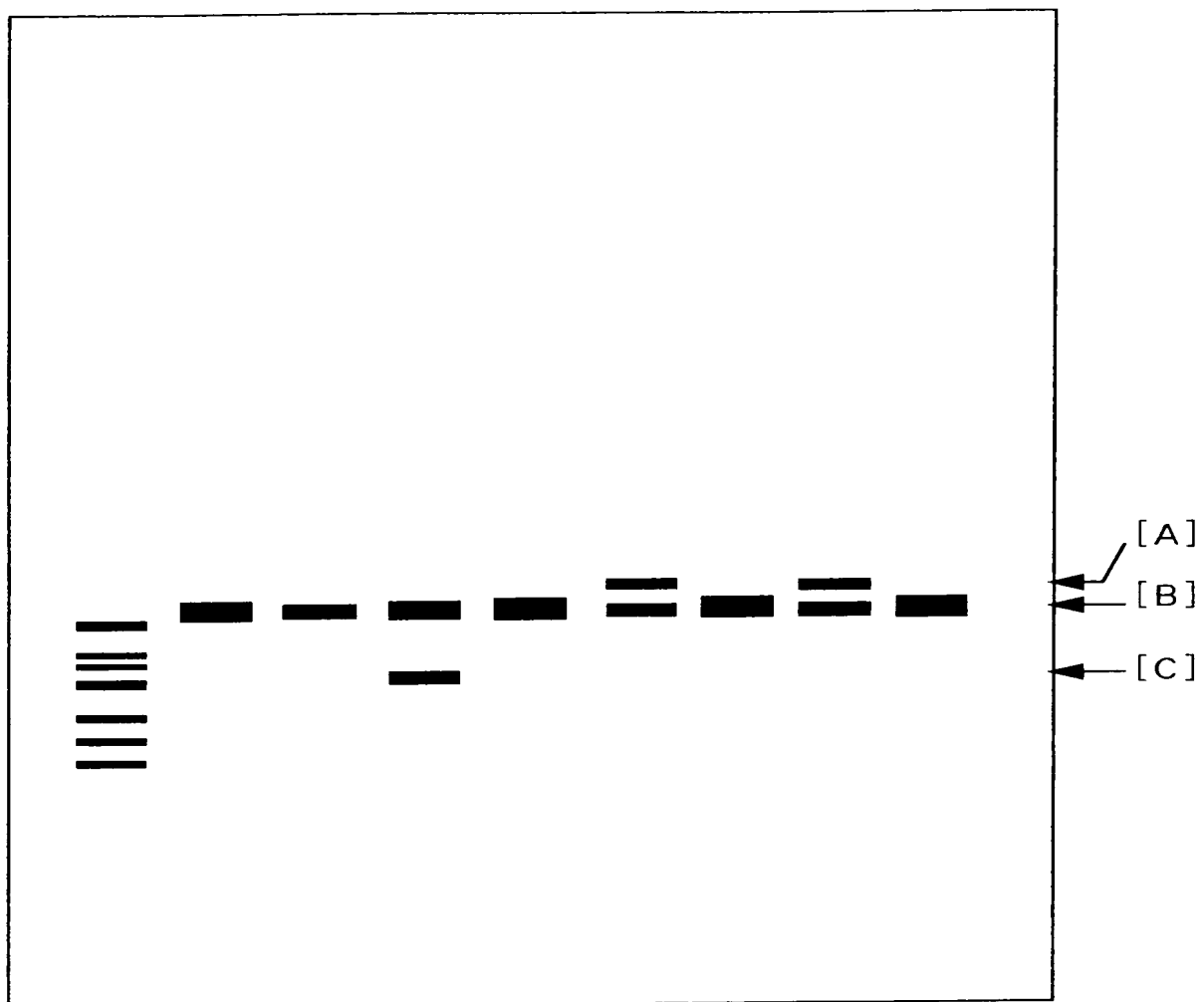


# 第7図





第8図





# SEQUENCE LISTING

·110· Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

·120· Mutant animals

·130· 98291M

·150· JP P1998-002191

·151· 1998-01-08

·160· 17

·210· 1

·211· 467

·212· PRT

·213· Human

·400· 1

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln 15

Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn 30

Asp Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly 45

His Pro Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg 60

Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu 75

Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr 90

Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe 105

Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 120

Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn 135

Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Leu Leu 150

Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala Trp 165

Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile 180

Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr 195

Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met 210



Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr 225  
Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr 240  
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 255  
Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 270  
Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala 285  
Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu 300  
Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr 315  
Asn Ala Glu Ser Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu 330  
Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp 345  
Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala 360  
Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu 375  
Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser 390  
Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn 405  
Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu 420  
Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu 435  
Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp 450  
Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe 465  
Tyr Ile 467

· 210 · 2

· 211 · 1404

· 212 · DNA





· 213 · Human

· 400 · 2

atg aca gag tta cct gca ccg ttg tcc tac ttc cag aat gca cag 45  
atg tct gag gac aac cac ctg agc aat act gta cgt agc cag aat 90  
gac aat aga gaa cgg cag gag cac aac gac aga cgg agc ctt ggc 135  
cac cct gag cca tta tct aat gga cga ccc cag ggt aac tcc cgg 180  
cag gtg gtg gag caa gat gag gaa gaa gat gag gag ctg aca ttg 225  
aaa tat ggc gcc aag cat gtg atc atg ctc ttt gtc cct gtg act 270  
ctc tgc atg gtg gtg gtc gtg gct acc att aag tca gtc agc ttt 315  
tat acc cgg aag gat ggg cag cta atc tat acc cca ttc aca gaa 360  
gat acc gag act gtg ggc cag aga gcc ctg cac tca att ctg aat 405  
gct gcc atc atg atc agt gtc att gtt gtc atg act atc ctc ctg 450  
gtg gtt ctg tat aaa tac agg tgc tat aag gtc atc cat gcc tgg 495  
ctt att ata tca tct cta ttg ttg ctg ttc ttt ttt tca ttc att 540  
tac ttg ggg gaa gtg ttt aaa acc tat aac gtt gct gtg gac tac 585  
att act gtt gca ctc ctg atc tgg aat ttt ggt gtg gtg gga atg 630  
att tcc att cac tgg aaa ggt cca ctt cga ctc cag cag gca tat 675  
ctc att atg att agt gcc ctc atg gcc ctg gtg ttt atc aag tac 720  
ctc cct gaa tgg act gcg tgg ctc atc ttg gct gtg att tca gta 765  
tat gat tta gtg gct gtt ttg tgt ccg aaa ggt cca ctt cgt atg 810  
ctg gtt gaa aca gct cag gag aga aat gaa acg ctt tti cca gct 855



ctc att tac tcc tca aca atg gtg tgg ttg gtg aat atg gca gaa 900  
 gga gac ccg gaa gct caa agg aga gta tcc aaa aat tcc aag tat 945  
 aat gca gaa agc aca gaa agg gag tca caa gac act gtt gca gag 990  
 aat gat gat ggc ggg ttc agt gag gaa tgg gaa gcc cag agg gac 1035  
 agt cat cta ggg cct cat cgc tct aca cct gag tca cga gct gct 1080  
 gtc cag gaa ctt tcc agc agt atc ctc gct ggt gaa gac cca gag 1125  
 gaa agg gga gta aaa ctt gga ttg gga gat ttc att ttc tac agt 1170  
 gtt ctg gtt ggt aaa gcc tca gca aca gcc agt gga gac tgg aac 1215  
 aca acc ata gcc tgt ttc gta gcc ata tta att ggt ttg tgc ctt 1260  
 aca tta tta ctc ctt gcc att ttc aag aaa gca ttg cca gct ctt 1305  
 cca atc tcc atc acc ttt ggg ctt gtt ttc tac ttt gcc aca gat 1350  
 tat ctt gta cag cct ttt atg gac caa tta gca ttc cat caa ttt 1395  
 tat atc tag 1404

210 3

211 467

212 PRT

213 Mouse

400 3

Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln 15

Met Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn 30

Asp Ser Gln Glu Arg Gln Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp 45

Asn Pro Glu Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg 60

Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu 75



Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr 90  
Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe 105  
Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 120  
Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn 135  
Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Leu 150  
Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala Trp 165  
Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile 180  
Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr 195  
Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met 210  
Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr 225  
Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr 240  
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 255  
Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 270  
Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala 285  
Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu 300  
Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr 315  
Asn Thr Gln Arg Ala Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly 330  
Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp 345  
Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala 360  
Val Gln Glu Leu Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu 375



Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser 390  
 Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn 405  
 Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu 420  
 Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu 435  
 Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp 450  
 Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe 465  
 Tyr Ile 467

· 210 · 4

· 211 · 1404

· 212 · DNA

· 213 · Mouse

· 400 · 4

atg aca gag ata cct gca cct ttg tcc tac ttc cag aat gcc cag 45  
 atg tct gag gac agc cac tcc agc agc gcc atc cgg agc cag aat 90  
 gac agc caa gaa cgg cag cag cag cat gac agg cag aga ctt gac 135  
 aac cct gag cca ata tct aat ggg cgg ccc cag agt aac tca aga 180  
 cag gtg gtg gaa caa gat gag gag gaa gac gaa gag ctg aca ttg 225  
 aaa tat gga gcc aag cat gtc atc atg ctc ttt gtc ccc gtg acc 270  
 ctc tgc atg gtc gtc gtc gtg gcc acc atc aaa tca gtc agc ttc 315  
 tat acc cgg aag gac ggt cag cta atc tac acc cca ttc aca gaa 360  
 gac act gag act gta ggc caa aga gcc ctg cac teg atc ctg aat 405  
 gcg gcc atc atg atc agt gtc att gtc att atg acc atc ctc ctg 450





gtg gtc ctg tat aaa tac agg tgc tac aag gtc atc cac gcc tgg 495  
 ctt att att tca tct ctg ttg ttg ctg ttc ttt ttt tgc ttc att 540  
 tac tta ggg gaa gta ttt aag acc tac aat gtc gcc gtg gac tac 585  
 gtt aca gta gca ctc cta atc tgg aat ttt ggt gtg gtc ggg atg 630  
 att gcc atc cac tgg aaa ggc ccc ctt cga ctg cag cag gcg tat 675  
 ctc att atg atc agt gcc ctc atg gcc ctg gta ttt atc aag tac 720  
 ctc ccc gaa tgg acc gca tgg ctc atc ttg gct gtg att tca gta 765  
 tat gat ttg gtg gct gtt tta tgt ccc aaa ggc cca ctt cgt atg 810  
 ctg gtt gaa aca gct cag gaa aga aat gag act ctc ttt cca gct 855  
 ctt atc tat tcc tca aca atg gtg tgg ttg gtg aat atg gct gaa 900  
 gga gac cca gaa gcc caa agg agg gta ccc aag aac ccc aag tat 945  
 aac aca caa aga gcg gag aga gag aca cag gac agt ggt tct ggg 990  
 aac gat gat ggt ggc ttc agt gag gag tgg gag gcc caa aga gac 1035  
 agt cac ctg ggg cct cat cgc tcc act ccc gag tca aga gct gct 1080  
 gtc cag gaa ctt tct ggg agc att cta acg agt gaa gac ccg gag 1125  
 gaa aga gga gta aaa ctt gga ctg gga gat ttc att ttc tac agt 1170  
 gtt ctg gtt ggt aag gcc tca gca acc gcc agt gga gac tgg aac 1215  
 aca acc ata gcc tgc ttt gta gcc ata ctg atc ggc ctg tgc ctt 1260  
 aca tta ctc ctg ctc gcc att ttc aag aaa gcg ttg cca gcc ctc 1305  
 ccc atc tcc atc acc ttc ggg ctc gtg ttc tac ttc gcc acg gat 1350



tac ctt gtg cag ccc ttc atg gac caa ctt gca ttc cat cag ttt 1395

tat atc tag 1404

·210· 5

·211· 25

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 5

ggaatttttg tgtggtcggg atgat

·210· 6

·211· 23

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 6

ggtcattcg gggagggtact tga

·210· 7

·211· 36

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 7

tgtggtcggg atgatcgcca cccactggaa aggccc

·210· 8

·211· 36

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 8

gggcatttc agtgggtggc gatcateccg accaca

·210· 9

·211· 18

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 9

tctagacggc cgtctaga

·210· 10



·211· 18  
·212· DNA  
·213· Artificial Sequence  
·400· 10

agatctgccg gcagatct

·210· 11  
·211· 30  
·212· DNA  
·213· Artificial Sequence  
·400· 11

cccaactcta tttctaccct cgttcacatctg

·210· 12  
·211· 30  
·212· DNA  
·213· Artificial Sequence  
·400· 12

tagtgagacg tgctacttcc atttgtcacg

·210· 13  
·211· 30  
·212· DNA  
·213· Artificial Sequence  
·400· 13

tgctggagga aaatgtgtta ttttaagagca

·210· 14  
·211· 30  
·212· DNA  
·213· Artificial Sequence  
·400· 14

tactgaaatc acagccaaga tgagccatgc

·210· 15  
·211· 30  
·212· DNA  
·213· Artificial Sequence  
·400· 15

ggtccatccc agcttcacac agacaagtct



·210· 16

·211· 30

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 16

tactgaaatc acagccaaga tgagccatgc

·210· 17

·211· 30

·212· DNA

·213· Artificial Sequence

·400· 17

tagtgagacg tgctacttcc atttgtcacg







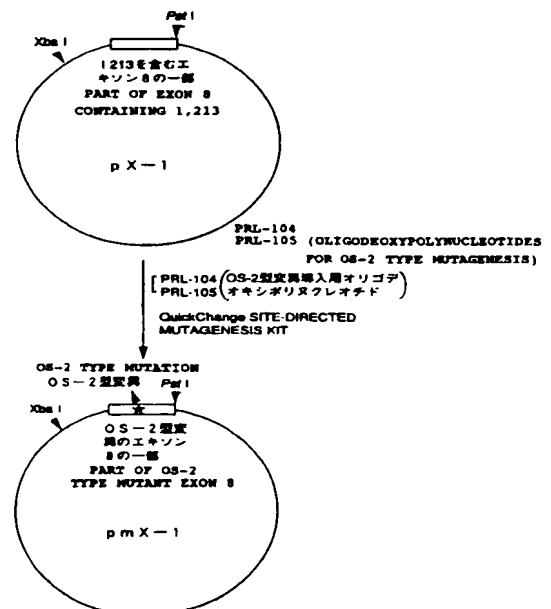
<p>(51) 国際特許分類6 A01K 67/027, A61K 45/00, C12N 15/12, G01N 33/15</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO99/34670</b></p> <p>(43) 国際公開日 1999年7月15日(15.07.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00015</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月7日(07.01.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/2191 1998年1月8日(08.01.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 武田雅俊(TAKEDA, Masatoshi)[JP/JP] 〒569-1021 大阪府高槻市弥生が丘町49の25 Osaka, (JP) 竹田潤二(TAKEDA, Junji)[JP/JP] 〒565-0824 大阪府吹田市山田西3丁目38の9 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title: GENE MUTANT ANIMALS

(54) 発明の名称 遺伝子変異動物

(57) Abstract

Gene mutant animals such as mice having a mutant presenilin-1 gene which contains a DNA sequence encoding a mutant presenilin-1 protein having an amino acid sequence derived from that of presenilin-1 protein by substitution of one amino acid (for example, one wherein isoleucine at the 213-position of mouse-derived presenilin-1 protein has been substituted by another amino acid such as threonine). These animals are useful as model animals being pathologically closer to human patients with Alzheimer's diseases.



## (57)要約

プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白 (例えばマウス由来のプレセニリン-1 蛋白の第 213 番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸、例えばスレオニンに置換した変異プレセニリン-1 蛋白) をコードする DNA 配列をコードする DNA 配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有するマウスなどの遺伝子変異動物。ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カムeroon	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

## 明 細 書

## 遺伝子変異動物

## 技術分野

本発明は、遺伝子導入動物に関するものである。より詳しくは、ヒト・アルツハイマー病を惹起するプレセニリン遺伝子の変異を導入したプレセニリン遺伝子導入動物に関する。

## 背景技術

アルツハイマー病は進行性の痴呆症状を呈する疾患であり、脳内での著しく多数の老人斑の出現と神経原線維変化の神経細胞内蓄積を病理組織学的特徴とし、緩徐に神経細胞が障害され脱落する神経変性疾患である。アルツハイマー病は高齢者に発症することが多く、加齢とともに罹患者の比率が増大することが知られている。現在のところアルツハイマー病の根治は不可能であり、将来的な高齢者人口の急増に備えてアルツハイマー病に対する治療や予防のための方法、並びにアルツハイマー病に対して有効な予防・治療剤の早急な開発が切望されている。

老人斑は種々の成分を含む神経細胞外の沈着物であり、アミロイド $\beta$ タンパク(A $\beta$ )と呼ばれる39～42個のアミノ酸残基からなるペプチドを主成分としている。アミロイド $\beta$ はアミロイド前駆体タンパク(amyloid precursor protein : APP)より $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼと仮称されているプロテアーゼで切断されて生じる。老人斑では、アミロイド $\beta$ が $\beta$ シート構造をとった堅固な構造物として沈着している。老人斑はび慢性老人斑と呼ばれる“しみ”状の沈着から始まるが、この段階では神経変性は生じておらず、更にび慢性老人斑が堅固な沈着物となるとともに、神経変性や神経細胞の脱落が生じることによって痴呆などのアルツハイマー病の症状が現れるものと考えられている。アミロイド $\beta$ としては主に40アミノ酸残基よりなるA $\beta$ 40と42アミノ酸残基より

なるA $\beta$ 42が存在する。細胞が生成するアミロイド $\beta$ の大部分はA $\beta$ 40であり、A $\beta$ 42は僅かに存在しているにすぎないが、A $\beta$ 42の方が凝集性が高く、A $\beta$ 40と比較して老人斑形成に果たす役割は大きいと考えられている（玉岡：内科77巻、843頁、1996年）。

アルツハイマー病には常染色体優性の遺伝を示す家族性の発症が認められる。この家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として最初に見つけられたものは、1991年第717番目のアミノ酸残基がバリンからイソロイシンに変異しているAPPの突然変異体であり、この遺伝子は21番染色体上に存在する（Goate A. 等：Nature 349巻、704頁、1991年）。

この他、アルツハイマー病の原因となるAPPの突然変異体として、同しく第717番目のアミノ酸残基がフェニルアラニンに変換したもの（Murrell J. 等：Science 254巻、97頁、1991年）、同じ位置のアミノ酸残基がグリシンへ変異したもの（Chartier, Harlin 等：Nature 353巻、844頁、1991年）、第670番目と第671番目の2アミノ酸残基がリジン・メチオニンからアスパラギン・ロイシンに変異したもの（Mullan M. 等：Nature Genet. 1巻、345頁、1992年）、第692番目のアミノ酸残基がアラニンからグリシンに変異したもの（Hendrick L. 等：Nature Genet. 1巻、218頁、1992年）等が見い出されている。

家族性アルツハイマー病の原因因子あるいは危険因子としてアポリポタンパクE（apo E）が1993年に報告された。すなわち、19番染色体上に遺伝子が存在するapo Eのアイソマーのうち第112番目のアミノ酸残基がアルギニンであり、第158番目のアミノ酸残基がアルギニンであるapo E4を保有する者の比率がアルツハイマー病患者では健常人と比較して有意に高いことが見つかった（Corder E. H. 等：Science 261巻、921頁、1993年）。

その後、1995年にアルツハイマー病の新たな原因遺伝子として、14番染色体上に存在する「プレセリニン-1」（PS-1；当初はS182と呼ばれていた）の遺伝子（Sherrington R. 等：Nature 375巻、754頁、1995年）の突然変異体および

1 番染色体上に存在する「プレセニリン-2」(PS-2;当初はF5-1あるいはSTM-2と呼ばれていた)の遺伝子(Rogaev E. I.等: Nature 376 巻、775 頁、1995年)の突然変異体が見いだされた(本明細書において、それぞれの遺伝子を「プレセニリン-1 遺伝子」及び「プレセニリン-2 遺伝子」と呼ぶ。また、それらの遺伝子産物をそれぞれ「プレセニリン-1 蛋白」及び「プレセニリン-2 蛋白」、又は「PS-1」及び「PS-2」と呼ぶ。)

プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白はそれぞれ 467 アミノ酸残基および 448 アミノ酸残基よりなる7回(又は8回)膜貫通型の1次構造を有しており、膜タンパクとして存在していると推測されている。両者のアミノ酸レベルでのホモロジーは高く、全体で67%、膜貫通部のみでは84%である。プレセニリン-1 蛋白の機能に関しては、線虫の *se1-12* タンパクや *SPE-4* タンパクとの高い相同性から、これらのタンパクと機能が類似している可能性が指摘されている。*SPE-4* タンパクは線虫の精子形成過程に関与するタンパクであり、タンパクの輸送・貯蔵に関与しているとされている。

従って、プレセニリン-1 蛋白はAPPのような膜タンパクのプロセッシング、軸索輸送、膜小胞の膜との融合過程などに関与する可能性が考えられている。また、*se1-12* は線虫の発生過程を制御している *lin-12* の突然変異による発生異常を救済する遺伝子として発見された。*lin-12* は細胞間情報伝達に関与していると考えられており、プレセニリン-1 蛋白も細胞間情報伝達のどこかに関与している可能性も示唆されている。

プレセニリン-1 蛋白について、最初の報告では、家族性アルツハイマー病の原因となる突然変異は5ヶ所のアミノ酸残基の置換であることが記載されている。この報告以降、本発明者等の報告したOS-2(第213番目のアミノ酸残基イソロイシンがスレオニンに変異)およびOS-3(第96番目のアミノ酸残基バリンがフェニルアラニンに変異)(Kamino K. 等: Neurosci. Lett. 208 巻、195 頁、1996 年)を初めとして、多くの家族性アルツハイマー病の家系から様々な個所の突然変異体が見つけられているおり、現在では30ヶ所以上で40種類

以上のアミノ酸残基の置換が知られている (Hardy : TINS 20 巻、154 頁、1997 年)。

現在ではプレセニリン-1 蛋白の突然変異は家族性アルツハイマー病の 70 ～ 80 % を占めると考えられている。PS-2 については 2 ヶ所の突然変異が報告されている。以上述べたように、PS-1 および PS-2 の突然変異体が家族性アルツハイマー病と深く関連していることが遺伝学的解析から証明されている。

一方、最近、プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異体がどのような機作でアルツハイマー病の発症の原因となっているかに関する研究も進められている。これらの突然変異体を持つアルツハイマー病患者の血清中や皮膚の腺維芽細胞の培養液 (Scheuner D. 等 : Nature Med. 2 巻、864 頁、1996 年)、プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異体で形質転換した培養細胞株の培溶液中 (Xia W. 等 : J. Biol. Chem. 272 巻、7977 頁、1997 年。Borchelt DR 等 : Neuron 17 巻、1005 頁、1996 年。Citron M. 等 : Nature Med. 3 巻、67 頁、1997 年)、及びプレセニリン-1 蛋白の突然変異体を持つ家族性アルツハイマー病患者の脳組織 (Lemere C. A. 等 : Nature Med. 2 巻、1146 頁、1996 年) において、 $A\beta$  40 は正常型のプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白に比べて殆ど変化が見られないが、 $A\beta$  42 は正常型のプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白と比較して大きく増加していることが報告されている。

すなわち、家族性アルツハイマー病をもたらすプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異は、老人斑の形成に大きな役割を果たすと考えられている  $A\beta$  42 を増加させることにより、アルツハイマー病を発症させる可能性が示されている。プレセニリン-1 蛋白の突然変異体をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスも作製されている (Duff K. 等 : Nature 383 巻、710 頁、1996 年。Borchelt DR. 等 : Neuron 17 巻、1005 頁、1996 年。Citron M. 等 : Nature Med. 3 巻、67 頁、1997 年)。これらのトランスジェニックマウスにおいてマウス脳内の  $A\beta$  42 が特異的に増加していることが報告されている。こ

の結果は、家族性アルツハイマー病をもたらすプレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン-2 蛋白の突然変異体は、老人斑の形成に大きな役割を果たすと考えられているA $\beta$ 42を増加させることにより、アルツハイマー病を発症させる可能性を強く支持するものである。しかしながら、これらのトランスジェニックマウスの報告ではトランスジェニックマウスの脳の組織学的検討に関する記載はされていない。これはトランスジェニックマウスで顕著な脳の組織学的変化が観察されていないことを推察させる。

一般的に、トランスジェニック動物は、対象とする遺伝子の生体内での機能を解析する手段としては有用である。しかしながら、導入した遺伝子の発現を量的・発現組織的・発生上の発現時期的に制御することは技術的に困難である。また、動物自体が持っている遺伝子が正常に発現しているために、トランスジェニック動物の体内では両方の遺伝子産物が混在した状態にあり、導入した遺伝子の機能解析が十分できないという問題もある。さらに、導入した遺伝子が特に過剰に発現される場合、本来生体内で果たしていない機能がトランスジェニック動物で現れてしまう場合があり、その結果、作製した遺伝子変異動物の解析に混乱をもたらすおそれがある等の難点もある。

トランスジェニック動物とは別に、対象とする遺伝子の機能を解析する手段としてノックアウト動物を利用することができる。ノックアウト動物は、動物自体が持っている対象の遺伝子を人工的に破壊して機能できない状態にしたものである。ノックアウト動物を詳細に解析することにより、対象としている遺伝子の生体内での機能を明らかにすることができる。しかしながら、破壊した遺伝子の産物の機能をノックアウト動物体内の別の遺伝子産物が代替するため、ホモ化してもノックアウト動物自体に特段の変化が現れてこないことがある。また、破壊した遺伝子の産物が動物の発生上・成育上必須であるためにホモでは致死となってしまう、成長可能なヘテロでは遺伝子の機能の詳細な解析が事実上不可能な場合があるという問題点も有している。

## 発明の開示

本発明の課題は、アルツハイマー病の病態モデル動物の作製にあたり、前記のような欠点を有するトランスジェニック動物ではなく、ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物を提供することにある。より具体的には、アルツハイマー病の原因遺伝子と考えられるプレセニリン遺伝子に変異を加えた遺伝子（変異プレセニリン遺伝子）を相同組換え法で導入することにより、変異プレセニリン蛋白を脳内で発現可能な遺伝子変異動物を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の遺伝子変異動物の作製方法、該作製方法に有用なプラスミド、及び該遺伝子変異動物を用いてアルツハイマー病の予防及び又は治療に有用な物質を評価する方法を提供することにある。

本発明者らは、プレセニリン-1 蛋白の役割を解明するため、及びプレセニリン-1 遺伝子の突然変異がどのような機作でアルツハイマー病を引き起こすのか解析するため、マウス自体が持っているプレセニリン-1 遺伝子を上記OS-2 型の変異をもつプレセニリン-1 遺伝子と入れ換えたノックインマウスを作製した。その結果、この遺伝子変異動物ではトランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの持つ欠点を回避することができ、変異プレセニリン-1 遺伝子をもつ家族性アルツハイマー病の病因・病態解明に有用であることを見出した。本発明者らはさらに研究を続け、下記に述べる本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、変異プレセニリン遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物を提供するものであり、より好ましくは、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有する遺伝子変異動物を提供するものである。

また、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列、好ましくはマウス由来のプレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、次の番号：

第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第23



1番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番からなる群から選ばれる1又は2以上の箇所のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含むプレセニリン-1変異遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物；

及び、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、好ましくはマウス由来のプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、

A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436S、

(各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。以下、本明細書において、変異プレセニリン-1蛋白及び変異プレセニリン-2蛋白について同様に表示する。)

からなる群から選ばれる1又は2以上の変異を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

さらに、プレセニリン-1蛋白の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物；及び、プレセニリン-1蛋白の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレ

セニリンー 1 蛋白をコードする DNA 塩基配列を含む変異プレセニリンー 1 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

これらの発明の好ましい態様に従い、

プレセニリンー 1 蛋白のアミノ酸配列中の第 2 1 3 番のアミノ酸の近辺をコードする DNA 配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、N は T 以外の塩基を意味し、M は T 又は C を意味し、下線を付した塩基が第 2 1 3 番のアミノ酸をコードする塩基である。) に変異した変異プレセニリンー 1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物：

プレセニリンー 1 蛋白のアミノ酸配列中の第 2 1 3 番のアミノ酸の近辺をコードする DNA 配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、N は C を意味し、M は T 又は C を意味し、下線を付した塩基が第 2 1 3 番のアミノ酸をコードする塩基である。) に変異した変異プレセニリンー 1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物：

プレセニリンー 1 蛋白のアミノ酸配列中の第 2 1 3 番のアミノ酸の近辺をコードする DNA 配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、X Y Z はイソロイシン以外のアミノ酸をコードする 3 塩基のコドンの意味し、M は T 又は C を意味し、下線を付した塩基が第 2 1 3 番のアミノ酸をコードする塩基である。) に変異した変異プレセニリンー 1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物が提供される。

別の観点からは、本発明により、プレセニリンー 2 蛋白のアミノ酸配列において、第 1 4 1 番及び/又は 4 3 6 番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した蛋白をコードする DNA 配列を含む変異プレセニリンー 2 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供され、その好ましい態様として、プレセニリンー 2 蛋白のアミノ酸配列において、N 1 4 1 I 及び/又は M 2 3 9 V の変異を有する変異プレ

セニリン-2 蛋白をコードする DNA 配列を含む変異プレセニリン-2 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

これらの遺伝子変異動物の好ましい態様として、アミロイドβ 蛋白の過剰発現が変異プレセニリン-1 遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2 遺伝子に起因する上記の遺伝子変異動物；変異プレセニリン蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が、哺乳類動物の脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ 蛋白を生産させるものである上記遺伝子変異動物；哺乳類動物の齧歯類、好ましくはマウスである上記遺伝子変異動物；変異プレセニリン-1 遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2 遺伝子が相同組換えにより導入された上記遺伝子変異動物；変異プレセニリン-1 遺伝子により引き起こされた脳組織でのアミロイド蛋白の発現量が、正常動物と比較して記憶学習試験において障害された行動を引き起こし、かつ当該動物の脳の海馬の大脳皮質周辺部において異常な神経病理を誘発するのに十分であることを特徴とする、上記遺伝子変異動物；並びに、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の 1 又は 2 以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子とマーカー蛋白をコードする塩基配列とを含む DNA を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

さらに別の観点からは、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第 213 番のアミノ酸の近辺をコードする DNA 配列が、次の配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'（ただし、N は A、G、又は C を意味し、M は T 又は C を意味し、下線を付した塩基は第 213 番のアミノ酸をコードする塩基である。）である変異プレセニリン-1 遺伝子を含むプラスミド；及び  
プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第 213 番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子であって、第 213 番のアミノ酸の付近をコードする DNA 配列が、次の配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'（ただし、M は T 又は C を意味し、XYZ はイソロイシン以外をコードする 3 塩基のコドン在意

味し、下線を付した塩基は第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)である遺伝子を含むプラスミドが提供される。プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAも提供される。

また、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のcDNA又は染色体DNAの全長又は変異部分を含む塩基配列に対してSau3AI部位が導入されたDNAを含むプラスミドが提供され、アミノ酸の置換が213番のイソロイシンからスレオニンへの置換である上記プラスミド：下記の塩基配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'（ここでMはT又はCを意味する。）で特定されるDNAを含むプラスミドが提供される。

これらに加えて、マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセニリン-1蛋白をコードする遺伝子；アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である上記遺伝子が提供される。また、(1)マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセニリン-1蛋白をコードする遺伝子、及び(2)loxPではさまれたネオマイシン発現ユニットを含むプラスミド；アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である上記プラスミドも提供される（loxPについては、すでに特表平4-501501号公報の第4頁に開示されている）。

さらに別の観点から、下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'（ここでMはT又はCを意味する。）で特定されるDNAを含むプラスミドが導入されたことを特徴とする胚；上記の各プラスミドを用いた相同組換えにより得られた胚；及び、哺乳類動物の齧歯類由来、好ましくはマウス由来の上記胚が提供される。また、上記の遺伝子

変異動物の細胞を単離し、組織培養により培養することにより得られる初代培養細胞又は継代培養細胞；並びに、変異プレセニリン-1 蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイド $\beta$  蛋白を生産させることができる変異プレセニリン-1 遺伝子を相同組換え法により動物の胚に導入する工程を含む、ヒト以外の遺伝子変異動物の作製方法；及び第2 1 3 番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に変異した変異プレセニリン-1 変異蛋白を発現することができる上記方法が提供される。

また、被検化合物を投与した上記遺伝子変異動物と無投与の該動物との比較を行う工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質の評価方法が提供される。この評価方法の代表例としてスクリーニング方法を挙げることができる。この発明の好ましい態様によれば、記憶学習試験により比較を行う上記評価方法；病理試験により比較を行う上記評価方法；大脳皮質周辺部での神経病理に基づく病理試験により比較を行う上記評価方法；神経病理に基づく病理試験による比較が、当該脳の大脳皮質周辺部での肥大したグリオーシスの減少の抑制、当該脳の大脳皮質周辺部での2-デオキシグルコース取り込みの減少の抑制、及び当該脳の大脳皮質での2-デオキシグルコース利用の減少の抑制からなる群から選択される1又は2以上の項目の比較である上記評価方法；並びに、当該動物の生存期間、探索行動、及び移動行動からなる群から選ばれる1又は2以上の項目について比較を行う上記評価方法が提供される。

さらに、上記初代培養細胞又は継代培養細胞を被検化合物が存在下でイン・ビトロ細胞培養する工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防剤の評価方法；OS-2 型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子の部分塩基配列を用いることを特徴とする、アルツハイマー病又はアルツハイマー病の発症可能性の診断方法；上記の各評価方法により選択されたアルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質；並びに、上記物質を有効成分として含むアルツハイマー病の治療及び/又は予防剤が提供される。

また、上記の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパク（APP）の変異蛋白質をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの産生量の多い動物とを掛け合わせるにより作製したハイブリッド動物およびその子孫であって、好ましくは、掛け合わせにより作製した、又は掛け合わせにより生まれたハイブリッドマウスおよびその子孫であって、変異プレセニリン遺伝子とアミロイド前駆体タンパクの変異蛋白質をコードする遺伝子を有する遺伝子変異動物が提供される。この発明の好ましい態様では、APPの変異蛋白質をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ の産生量の多い動物が、PS1変異マウスである上記遺伝子変異動物が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、マウス・ジェノミックDNAライブラリーよりクローニングして得たマウスプレセニリン-1のエキソン8を含む染色体DNA断片P $\alpha$ の制限酵素地図である。

第2図は、部位特異的変異導入法によりOS-2型変異が導入された部位を含むマウスプレセニリン-1遺伝子のエキソン8の一部を持つプラスミドpmX-1の作製方法の工程を示した図である。

第3図は、ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

第4図は、ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

第5図は、ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

第6図は、ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

第7図は、ターゲッティングベクターの作製の工程と、ターゲッティングベクター-pOS-2neoIoxPの構造を示した図である。

第8図は、OS-2型変異プレセニリン-1遺伝子をもつ#2マウス（雄）とCAG-cre #13 マウスのF4（雌）を交配して得られた仔の尾の一部を切断した試料から得られた染色体DNAを、例10に記載した方法でPCRを行った産物の1%アガロースゲル電気泳動の結果を示した図である。右側から2番目と4番

目のマウスは染色体DNA上に neo 発現ユニットをもっていないことが示されている。図中、最左端のレーンは分子量マーカーである。[A]は、染色体DNA上の neo を欠損していることをバンドであり、[B]は染色体DNAが野生型であることを示すバンドであり、[C]は染色体DNA上の neo 存在していることを示すバンドである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子変異動物の作製に用いられる変異プレセニリン遺伝子（本明細書において「変異プレセニリン遺伝子」という場合には、変異プレセニリンー1遺伝子及び変異プレセニリンー2遺伝子のいずれか片方又は両者を意味する）は、変異プレセニリン蛋白（本明細書において「変異プレセニリン蛋白」という場合には、変異プレセニリンー1蛋白及び変異プレセニリンー2蛋白のいずれか片方、又は両者を意味する）をコードする遺伝子である。この変異プレセニリン遺伝子はアミロイドβ蛋白の生産量を増加させる性質を有している。本発明の遺伝子変異動物は、上記の変異プレセニリン遺伝子が、例えば相同組換え法により導入された哺乳類動物である。変異プレセニリン蛋白に存在する変異は、好ましくはアミノ酸残基の置換により生じたものであり、その変異の個数は制限されないが、好ましくは1個である。

哺乳類動物由来のプレセニリンー1蛋白の全長は、例えば E. Levy-Lahad, et al., Science, 269, pp. 973-977, 1995 に記載されている。ヒト及びマウス由来のプレセニリンー1蛋白の全長及び該蛋白をコードするDNA の一例をそれぞれ配列表の配列番号1～4に示した。例えばマウス由来のプレセニリンー1蛋白においては、変異部位は、第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第231番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第41

0番、第426番、及び第436番から選ばれる1又は2個所以上であることが好ましい。

より好ましい変異は、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、より好ましくはマウス由来のプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436Sからなる群から選ばれる1又は2以上の変異である。これらの変異のうち、第213番のアミノ酸が他のアミノ酸へ置換する変異（本明細書において「OS-2型変異」という場合がある。）は特に好ましい変異であり、例えば、第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異、又は第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異が特に好適である。

哺乳類動物由来のプレセニリン-2蛋白の全長は、例えば Science, 269, pp. 973-977, 1995 に記載されている。変異部位としては、第141番及び/又は436番が好ましく、マウス由来の配列においてはN141I及び/又はM239Vがより好ましい。プレセニリン-1蛋白及びプレセニリン蛋白-2のいずれか片方、又は両者に変異が存在していてもよい。

本発明の遺伝子変異動物は、その染色体DNA上に上記の変異プレセニリン-1遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2遺伝子を有することを特徴としている。本発明の遺伝子変異動物は哺乳類動物であればよく、その種類は特に限定されないが、例えば、ゲッ歯類動物を好適に用いることができる。特に好ましいのはマウスである。本発明の遺伝子変異動物は、変異プレセニリン遺伝子を含む約10kbp程度の配列を有するDNAを用いてプラスミドを作製し、そのプラスミド



を胚性幹細胞に導入することにより、細胞内で相同組換えを起こさせることにより作製することができる。

本発明の遺伝子変異動物は、上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2 遺伝子が相同組換えにより導入された結果、アミノ酸変異がほとんどの場合1 個所で起こるという特徴がある。いわゆるトランスジェニック動物の場合には、変異部分のDNA 配列がランダムに染色体DNA 上に挿入され、多くの場合、繰り返し配列の数十コピーが複数箇所に挿入されている。本発明の遺伝子変異動物ではこのような問題が回避されており、アルツハイマー病の病態を遺伝子レベルで正確に解析することが可能である。もともと、本発明の遺伝子変異動物においてマーカー等を含むDNA を導入した場合は、そのマーカー部分及びマーカーを挿入するための配列などを含む場合もある。例えば、Sau3AI で切断可能な部位を挿入するために1 塩基を置換することができ、PCR 産物をSau3AI で切断して電気泳動等で確認することができる。

本発明の遺伝子変異動物は、その遺伝子変異の結果、正常動物に比べてβ アミロイド蛋白をより多量に生産するという特徴を有している。本発明の遺伝子変異動物により達成されるアミロイドβ 蛋白の増加量は特に限定されないが、例えば、記憶障害、病理所見、各種の神経障害の程度を評価した場合に正常動物との間で実質的な差異が認められる程度であることが好ましい。

本発明により提供されるDNA、プラスミド、培養細胞、及び哺乳類動物細胞の胚も同様に上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2 遺伝子を有することにより特徴づけられる。例えば、変異プレセニリン-1 蛋白、好ましくはOS-2 型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のcDNA 若しくは染色体DNA の全長又は変異部分を含むDNA 配列；上記cDNA 若しくは染色体DNA の全長又は変異部分を含むDNA 配列に Sau3AI 部位を導入したDNA を含むプラスミド；OS-2 型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8 を含む染色体DNA はいずれも本発明の範囲に包含される。また、これらの遺伝子又はDN

Aにおいて1又は2個以上、好ましくは1個ないし20個、より好ましくは1個ないし数個の塩基が置換したものも本発明の範囲に包含される。

本発明のDNA又はプラスミドの例としては、例えば、

1) プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子からなるDNA、及び該DNAを含むプラスミド；

2) 変異プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番付近のアミノ酸をコードするDNA塩基配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAT M GCCA N CCACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味する。)である変異プレセニリン-1遺伝子からなるDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

3) OS-2型変異変異プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番付近のアミノ酸をコードするDNA塩基配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAT M GCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味する。)である変異プレセニリン-1遺伝子からなるDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

4) Sau3AI 制限部位が導入された前記1)～4)のいずれかに記載のDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

5) プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換された変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1の遺伝子のcDNA若しくは染色体DNAの全長又は変異部分を含んだ配列にSau3AI 制限部位が導入されたDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

6) OS-2型変異マウスプレセニリン-1蛋白をコードする変異マウスプレセニリン-1遺伝子のエキソン8と、loxP ではさまれたネオマイシン (neomycin) 発現ユニットとを含むDNA、又は該DNAを含むプラスミド；並びに

7) プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがスレオニ

ンに置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 と、loxP では含まれたネオマイシン (neomycin) 発現ユニットとを含む DNA、又は該 DNA を含むプラスミド

などを挙げることができるが、本発明の範囲はこれらの具体例に限定されることはない。

本発明により提供される胚又は細胞としては、上記のプラスミド、例えば PRL-104 又は PRL-105 の塩基配列を有するプラスミドを挿入した胚又は細胞を挙げることができる。また、前記のプラスミドを用いた相同組換えにより、プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列の第 213 番に変異を含む変異プレセニリン-1 蛋白をコードする遺伝子を導入した細胞は、本発明の好ましい細胞である。胚又は細胞は哺乳類動物由来であればその種類は特に限定されないが、ゲッ歯類動物由来、好ましくはマウス由来の胚又は細胞を用いることができる。

#### [遺伝子変異動物の作製]

ヒト変異プレセニリンをコードする DNA を入手した後に、本発明のプレセニリン遺伝子変異動物を以下に述べる工程に従って作製することができる。以下、哺乳類動物としてマウスを用い、ヒト変異プレセニリン遺伝子としてヒト・変異プレセニリン-1 遺伝子を用いる例について説明するが、本発明の遺伝子変異動物はこれらを用いて作製されるものに限定されることはない。また、この方法は本発明の遺伝子変異動物の作製方法の一例であり、本発明の遺伝子変異動物の作製方法は以下の方法に限定されることはない。ここに記載された一般的な方法及び実施例に記載された具体的な方法を参照することにより、また必要に応じてこれらの方法に適宜の修飾ないし改変を加えることにより、当業者は本発明の遺伝子変異動物を容易に作製することができる。

まず、PCR 法で用いるプローブを作製するために、マウス・ジェノミク DNA ライブラリーから、作製しようとする変異動物のプレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 中の変異させる部位を含む DNA 断片を得る。マウス・ジェノミク

クDNAライブラリーとしては、実施例で述べる 129 系統のマウスジェノミックDNAのほか、いかなる系統のマウスのジェノミックDNAライブラリーを用いてもよい。変異を導入しようとする動物としてマウスを用いる場合には、マウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を用いるが、他の種類の動物においては適宜の部分を選択する必要がある。

つぎに、上記工程で作製したDNA断片をランダムプライミングでラベル化(<sup>32</sup>P)した後、ラベル化したプローブを用いてジェノミックライブラリーをスクリーニングし、プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA断片をクローニングする。さらに、クローニングしたプレセニリン-1 遺伝子のエキソン8中の変異させる部分をサブクローニングした後に変異を導入する。

変異を導入したマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAを含むターゲッティングベクターを作製する。ターゲッティングベクターには、選択マーカーとして neo 発現ユニットを導入しておき、G418 (抗生物質) を培地に添加することにより、ベクターが染色体に導入されなかった細胞を死滅させるようにしておく。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法や遺伝子を細胞内に導入する他の方法によってES細胞に導入した後、G418存在下でES細胞を培養し、出現してくるコロニーを採取する。得られたコロニーを二つに分け、一つは培養・継代あるいは凍結により保存しておき、他の一つを使用して相同組換えにより目的とするマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8の変異が導入されたES細胞を調べる。目的とする変異が導入されたES細胞のコロニーの保存してある分を取り出して以下の工程に用いる。

別途、妊娠マウスから8細胞期胚を取り出し、上記の保存してあった約20個位のES細胞をまぶした後、偽妊娠させたメスマウスの子宮に導入する。生まれてきた仔の中から毛色がキメラのマウスを選択する。キメラマウスをC57BL/6系統と交配させ、生まれてきた仔の中から毛色がアグチのものを選択することにより、目的とする変異の入ったマウスを取得することができる。なお、このマウスは変異の入ったプレセニリン-1 遺伝子に関してはヘテロであり、もう1本の染

色体にあるプレセニリン-1 遺伝子は変異のない野生型である。

マウス・プレセニリン-1 遺伝子のエクソン8を含む染色体DNAをマウス・ジェノミックDNAライブラリーからクローニングするためのプローブを作製するための出発材料としては、実施例に具体的に述べる方法のほか、塩基配列が明らかにされているマウスやヒト等の他の哺乳類動物由来のプレセニリン-1 遺伝子のcDNAを用いてもよい。プローブとなるDNA断片を得る方法としては、実施例に述べるPCR法による増幅法のほか、染色体DNAのマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエクソン8に対応する部分を含むマウス染色体DNA、又は塩基配列が明らかにされているマウスやヒト等の他の哺乳類動物由来のプレセニリン-1 遺伝子のcDNAを含むプラスミドを大量に調製する方法などを採用することができる。また、このプラスミドを制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動等の手段を用いてDNA断片として必要な部分を分取することによっても目的のDNA断片を得ることができる。

DNA断片をラベル化する方法としては、実施例に述べるランダムプライミング法のほか、<sup>32</sup>P-dNTP 存在下にPCRを行う方法などを用いることができる。また、予めラベルしたオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして使用することにより、PCR法あるいはランダムプライミング法でラベル化してもよい。ラベル化には、実施例に示すラジオアイソトープのほか、ビオチン-アビジン (Biotin-Avidin)系あるいはアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase) 等を用いる化学発光法も利用できる。また、T3 又は T7 RNAポリメラーゼを用いてラベルしたRNA断片をプローブとして使用できる。その他、プローブを作製する方法は種々知られており、いかなる方法を採用して目的とするプローブを取得してもよい。

目的とする変異をDNAに導入する方法としては、実施例に具体的に示した方法のほか、M13 等のファージ由来のプラスミド又は *ung*<sup>-</sup> 大腸菌を用いて複製したプラスミドを用いて、目的の変異を導入したい部分に変異を導入するために合成したオリゴデオキシヌクレオチドを相補的に（変異導入部位の塩基のみは相補

的ではない) 結合させ、これをプライマーとしてDNAポリメラーゼでヘテロな二本鎖DNAプラスミドを作製し、このプラスミドで大腸菌(*ung<sup>r</sup>*) を形質転換することにより目的の変異を持ったプラスミドを取得することができる。また、目的とする変異を導入するために塩基を変更してあり、かつ互いに相補的にアニールすることができ、両端に制限酵素部位が生じるように設計された二本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、変異を導入すべきプラスミドにDNAリガーゼを用いて結合させる方法(カセット法)を採用して、目的の変異を持ったプラスミドを取得することもできる。これらの方法を目的に応じて適宜修飾ないし改良することにより、一層効率的に目的を達成できる場合がある。これらの他、変異を導入する方法は当業界で利用可能な種々の変異導入法が知られており、いずれの方法によっても目的を達成できる。

ターゲッティングベクターは、変異を導入したマウス染色体DNA断片、選択マーカーをコードするDNA断片、これの転写を制御するためのプロモーター、及びターミネーターを含む選択マーカー発現ユニットを必須要素として含んでいることが好ましい。変異を導入したマウス染色体DNA断片は、ES細胞内で相同組換えを起こすために必要な部分であり、変異を導入した箇所を挟んで前後のマウス染色体DNA断片が必要である。すなわち、ターゲッティングベクターは、変異させた塩基のみが本来のマウス染色体DNAとは異なるDNA断片を持っている。その断片の長さは10 kbp程度が好ましいが、一般的には多少の長さの増減は許容される。もっとも、あまりに短い場合には、ES細胞内での相同組換えの頻度が低下する場合がある。

選択マーカーとしては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイクロマイシン耐性遺伝子等のポジティブ選択マーカー、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素Aフラグメント等のネガティブ選択マーカーなどが知られており、培養細胞株の選択マーカーとして使用されている選択マーカーはES細胞において何れも使用することができる。ネガティブ選択マーカーを使用する場合は、ターゲッティングベクターのマウス染色体DNA断片の外に挿入することが

必要であり、ポジティブ選択マーカーを使用する場合は、その発現ユニットをターゲットティングベクターのマウス染色体DNA断片の中のイントロン中に挿入することが必要である。ポジティブ選択マーカーをエキソン中に挿入すると、挿入された遺伝子は機能を失うのが通常であり、最終目的である変異の影響を調べるために作製するマウスを得ることができない場合がある。

E S細胞株としては 129 系統のマウス由来の株が多く使用されているが、この系統のE S細胞としては、実施例で述べる R1 のほか、D3、CCE、J1、AB1 などのE S細胞を用いてもよい。また、例えば C57BL/6 系統のマウス等、129 系統以外のマウス由来のE S細胞も使用できる。E S細胞にターゲットティングベクターを導入する方法としては、実施例で述べるエレクトロポレーション法が一般的であるが、リン酸カルシウム共沈法やリボソーム法など、培養細胞株へのプラスミド導入に利用可能な方法であれば何れの方法を採用してもよい。ターゲットティングベクター導入後のE S細胞を選択マーカー存在下で培養すると、生き残ってコロニーを形成するE S細胞は相同組換えを起こしている可能性がある。これらのコロニーを形成したE S細胞の中から相同組換えを起こしている細胞を調べる方法として一般的にはPCR法が用いられるが、プローブとして使用できるDNA断片、RNA断片、合成オリゴデオキシヌクレオチド、又は抗体などを使用することも可能である。

E S細胞を発生初期の受精卵に混入させた後、発生を継続させ、精子あるいは卵子がE S細胞由来のマウスを得ることができる。相同組換えを起こしたE S細胞を発生初期の受精卵に混入させる方法としては、実施例に述べる方法のほか、細胞胚期の受精卵を妊娠マウスより取り出し、これに注入用ピペットで 10~20 個のE S細胞を注入した後、偽妊娠させたメスマウスの子宮に移植することにより発生を継続させて仔を得る方法などを採用することができる。

E S細胞を混入させる際に使用する発生初期の受精卵はいずれの系統のマウスから採取したものでもよいが、混入させたE S細胞が生まれた仔に取り込まれているかどうか分かりやすいように、E S細胞の元になっている系統のマウスとは

毛色の異なる系統のマウスの受精卵を使用するのが好ましい。例えば、実施例において使用したES細胞はアグチ色 (agouti 色、淡褐色) の 129 系統であり、受精卵が由来するマウス (C57BL/6 系統) は黒色の系統である。これらを用いて生まれてきた仔の中からキメラの毛色をしている仔を選択することにより、ES細胞由来の細胞を持っている仔を容易に選択することが可能である。この場合、アグチ色の割合の多い仔ほど生殖細胞がES細胞由来となっている可能性が高い。なお、偽妊娠させるマウスはどの系統のマウスでもよい。

得られたキメラマウスを交配させて目的とする変異導入マウスを取得するために使用するマウスも、ES細胞の元になっている系統のマウスとは毛色の異なる系統のマウスを使用するのが好ましい。通常、キメラマウスのオスと他系統のメスを交配させ、アグチ色の仔を得ればそれが目的とする変異をヘテロの状態で持っているマウスである。OS-2型変異のプレセニリン-1遺伝子を持つマウスは、lox P配列で挟まれた neo 発現ユニットを有しているため、cre 遺伝子導入トランスジェニックマウスとの交配により neo 発現ユニットが取り除かれたマウスを得ることができる。

本明細書の従来技術で述べたように、プレセニリン-1蛋白及びプレセニリン-2蛋白の突然変異は、A $\beta$ 42の増加により老人斑の形成を促進し、アルツハイマー病を発症させると考えられる。一方、家族性アルツハイマー病の原因であるAPPの突然変異体をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおいて、脳内にアミロイド沈着を生じるマウスが報告されている (Games D. 等: Nature 373 巻、523 頁、1995 年。Hsiao K. 等: Science 274 巻、99 頁、1996 年。Sturchler-Pierrat C. 等: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 巻、24 号、13287 頁、1997 年)。これらのトランスジェニックマウスでは、脳内でのA $\beta$ の産生量が増加しているためにアミロイド沈着が生じていると考えられている。

APPの突然変異体をコードする遺伝子が導入され、脳内にアミロイド沈着を生じるトランスジェニック動物(導入遺伝子に関してホモであってもヘテロであってもよい)と、本発明のPS1遺伝子変異動物(変異遺伝子に関してホモであっ



でもヘテロであってもよい)とを交配することにより、ハイブリッド動物を作製することができる。動物としてはマウスが好ましい。交配に際して、どちらの側の動物がオスであってもよい。

得られる仔の尾の一部を採取し、染色体DNAを抽出する。抽出した染色体DNAを基質として、APPの突然変異体をコードする遺伝子の突然変異部位を挟むように設計した塩基配列を持つ二本のオリゴデオキシヌクレオチドおよび変異PS1遺伝子の変異部位を挟むように設計した塩基配列を持つ二本のオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行う。

PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無、バンドのゲル上での易動度、変異部位を含む塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドを用いたハイブリダーゼーションによる変異を含むバンドの確認等により、抽出した染色体DNAに、APPの突然変異体をコードする遺伝子および本発明の変異PS1遺伝子が含まれているかどうかを調べることができる。PCRは実施例の例8に記載した方法に準じて行うことができる。PCRのプライマーに使用するオリゴヌクレオチドの塩基配列は、APPの突然変異体をコードする遺伝子あるいは変異PS1遺伝子を検出できるものであればいかなるものでもよい。PCRの結果に基づいて、APPの突然変異体をコードする遺伝子を有し、かつ、本発明の変異PS1遺伝子を持つ動物を選抜することにより、両遺伝子をそれぞれヘテロで持つ動物を得ることができる。

APPの突然変異体をコードする遺伝子および本発明の変異プレセニリン-1遺伝子の両遺伝子をホモで持つ動物を得るためには、この両遺伝子をそれぞれヘテロで持つ動物のうち、適当なオスおよびメスを選んで交配することにより得られる仔の中から、両遺伝子をホモで持つ個体を選択すればよい。APPの突然変異体をコードする遺伝子をホモで持つことを確認するためには、仔の尾の一部を採取し、染色体DNAを抽出し、抽出した染色体DNAを制限酵素で切断した後、アガロースゲル又はアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行なう。その後、メンブランフィルターにDNAをブロッティングした後、APPの突然変異体をコ

ードする遺伝子と特異的に結合できる塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドをプローブとしてサザンブロッディングを行い、得られるバンドの濃さを測定すればよい。

この方法に準じて本発明の変異プレセニリン-1 遺伝子をホモで持つことを確認することができる。サザンブロッディングにプローブとして用いるオリゴデオキシヌクレオチドは、放射性同位元素、蛍光色素等サザンブロッディングに通常使用される手段により標識して用いることが可能である。このようにして、APP の突然変異体をコードする遺伝子および本発明の変異プレセニリン-1 遺伝子の両遺伝子を持つマウスを作製することができる。このような方法で作製したハイブリッドマウスは、脳内のアミロイドβタンパクの生産がより多く、また、アミロイドの沈着が促進されているという特徴がある。

本発明の遺伝子変異動物、変異プレセニリン遺伝子を導入した細胞、変異プレセニリン遺伝子を含むプラスミド等を用いて、アルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質をスクリーニングし、その有用性を評価することができる。健常な哺乳類動物ではアミロイドβの蓄積は極めて徐々に生じるが、本発明の遺伝子変異動物は、アミロイドβの産生が多いという特徴を有している。従って、本発明の遺伝子変異動物に種々の被検物質を投与し、非投与群の動物又は対照物質投与動物と比較することにより、アルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質を評価することができる。評価の代表例として被検物質のスクリーニングを挙げることができ、試験項目としては、症状、病理所見、薬理試験等を採用することができる。

また、本発明の細胞を用いる場合には、本発明の動物から分離して初代培養細胞として用いることができるほか、その初代培養細胞をウイルス等で不死化した後、継代培養して数日毎に当該培養細胞の一部を取り出して再び新しい組織培養液で培養することにより、当該細胞を安定して継代培養細胞とすることができる。なお、本発明の細胞には、遺伝子変異動物から分離した神経細胞などの初代細胞のほか、初代細胞を継代培養していわゆるライン化された継代培養細胞も包含さ

れる。本発明の細胞として神経細胞を用いる場合には、細胞が変異プレセニリン-1 蛋白を発現する結果としてアミロイド $\beta$  蛋白が多量に発現される。このような神経細胞のインビトロの培養系に被検物質を添加した後、例えば細胞の生存期間や一定期間経過後の生細胞数などを比較することにより、アミロイド $\beta$  蛋白の蓄積が関与する神経細胞死を予防又は遅延させる物質をスクリーニングし、その有用性を評価することができる。

### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの例に限定されることはない。実施例中、プレセニリン-1 遺伝子をPS-1 と略する場合がある。

例1：マウス・プレセニリン-1 (PS1) 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAのクローニング

マウスPS1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA断片取得用のプローブ作製のため、まず下記の2本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。

PR-8-U: 5'-GGAATTTTGGTGTGGTCGGGATGAT-3' (25mer)

PR-8-L: 5'-GGTCCATTTCGGGGAGGTACTTGA-3' (23mer)

この2本のオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、129SVJマウスジェノミックライブラリー(Stratagene社製)より抽出したDNAを用いてPCRを行い、得られた約130bpの増幅されたDNA断片を得た。この断片を $^{32}$ P-dCTP存在下、ランダムプライムラベル法によりラベルしたものをプローブとし、129SVJマウスジェノミックライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性ファージクローンの塩基配列を調べ、目的とするマウスPS-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAを持ったクローンであること確認した。このクローニングした染色体DNAをP $\alpha$ とし、その制限酵素地図を作製した(図1)。

## 例 2 : 突然変異導入用プラスミドの作製 :

P $\alpha$ を持つクローン化したファージよりDNAを抽出し、Sal I で切断後、1.0% アガロースゲル電気泳動を行い、P $\alpha$ を回収した。P $\alpha$ を Pst I および Xba I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、マウスPS-1の第213番目のアミノ酸であるイソロイシンをコードしている塩基を含む約600bpのDNA断片を回収し、これをX-1とした。X-1を予め Pst I および Xba I で切断したプラスミド pBluescript II KS+ (Stratagene 社製) と T4 リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pX-1 を得た。

## 例 3 : OS-2 型突然変異の導入 :

プラスミド pX-1 に下記の2本のオリゴデオキシヌクレオチド PRL-104 および PRL-105 を用いて、OS-2 型突然変異および制限酵素 Sau3AI 部位を新たに導入した。なお、PRL-104 および PRL-105 は何れも 36mer で、互いに相補性となっている。

PRL-104 : 5'-TGTGGTCGGGA TGATC\* GCCA C CCACTGGAAAGGCCCC-3'

PRL-105 : 5'-GGGCCTTTCCAGTGG G TGGCG\* ATCATCCCGACCACA-3'

(下線を付した塩基はOS-2 型変異導入のため本来の塩基を変異させてある : PRL-104 では本来はT、PRL-105 では本来はAである。また、アステリスクを付した塩基は Sau3AI 部位導入のため本来の塩基を変異させてある : PRL-104 では本来はT、PRL-105 では本来はAである)。

変異の導入は QUICK CHANGE SITE DIRECTED MUTAGENESISKIT (Stragene 社製) を使用し、同社のプロトコールに従って実施した。塩基配列を調べて変異が正しく導入されていることを確認し、この変異を持ったX-1をmX-1とし、mX-1を持つプラスミドをp mX-1とした(図2)

## 例 4 : OS-2 型変異を持った染色体DNAの作製

例1で得たマウスPS-1のエキソン8を含むP $\alpha$ をNco I で切断後、4種類の

d N T P s 存在下、T 4 D N A ポリメラーゼで平滑末端とした。ついで、Asp718I で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン8を含む約5 kbp のD N A断片を回収した。このD N A断片を、予め Sma I および Asp718 I で切断したプラスミド pBluescript II KS+とT 4 D N Aリガーゼで結合し、大腸菌を形質転換してプラスミド pSB-0 を得た。pSB-0 を Xba I で完全に切断した後、Pst I で部分消化を行った。一方、pmX-1 を Xba I および Pst I で切断した後、1 %アガロースゲル電気泳動を行い mX-1 を回収した。上記の Pst I 断片に mX-1 をT 4 D N Aリガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、プラスミド pSB-0 の X-1 部分が mX-1 と置換されているプラスミドを持つコロニーを選択し、回収したプラスミドを pmSB-0 とした (図3)。

また、P α を BamH I および Sal I で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行い、約7 kbp のエキソン8を含むD N A断片を回収した。予め Bam H I および Sal I で切断した pBluescript II KS+をこの断片にT 4 D N Aリカーゼで結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pSB-1 を得た。pmSB-0 を Nco I で切断後、4種のd N T P s 存在下 T4D N A ポリメラーゼで平滑末端化し、更に XbaI で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行った。回収したエキソン8を含む約2.2 kbp のD N A断片XNと pSB-1 を Xba I および Pst I で切断後、1 %アガロースゲル電気泳動を行った。回収したエキソン8を含まない約2.3 kbp のD N A断片PXをT 4 D N Aリカーゼで結合させた。これを、予めXba I で切断してから4種のd N T P s 存在下にT 4 D N Aポリメラーゼで平滑末端化した後、T 4 D N Aリカーゼで再結合させ、さらに Sma I および Pst I で切断したプラスミド pBluescript II KS+とT 4 D N Aリガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、D N A断片NXとXPが Xba I 部位で結合したD N A断片を1個だけ含むプラスミド pmSB-0' を得た (図4)

例5：ターゲッティングベクターの基本骨格の作製

プラスミド pmSB-0' を Xba I 部位に Eag I 部位を導入するため次の塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。

5'-CTAGACGGCCGT-3' (12 mer)

このオリゴデオキシヌクレオチドは CGGCCG 部分の相補性を持つ塩基配列を介してアニールすることができ、Xba I で切断した部位に挿入すると以下のようになる。

5' -	T C T A G A C G G C C G T C T A G A -	3'
3' -	A G A T C T G C C G G C A G A T C T -	5'
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <span>X b a I</span> <span>E a g I</span> <span>X b a I</span> </div>	

プラスミド pmSB-0' を Xba I で切断後、このオリゴデオキシヌクレオチドを加え T4 DNA リガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換し、プラスミド pmSB-0' の Xba I 部位に Eag I 部位が挿入されたプラスミド pmSB-0' eag を得た。この pmSB-0' eag を Nco I および Sal I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン8を含む約 5.3 kbp の DNA 断片 SN を回収した。また、pSB-1 を BamHI および Nco I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン8を含まない約 2 kbp の DNA 断片 NB を回収した。SN および NB を T4 DNA リガーゼで結合させ、BamH I および Sal I で処理することにより、両 DNA 断片が Nco I 部位で結合した DNA 断片を得た。この DNA 断片を、予め、Not I で切断後マングベーンヌクレアーゼ処理により平滑末端化し、T4 DNA リガーゼで再結合させることにより Not I 部位およびそれに重なっている Eag I 部位を壊し、さらに BamH I および Sal I で切断したプラスミド pBluescript II KS+ と T4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pA を得た (図5)。

## 例6：ターゲッティングベクターの作製

プラスミド pPNT (Victor L. J. 等 : Cell 65 巻、1153 頁、1991 年) を Xho I および BamH I で切断後、T 4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化し、1 % アガロースゲル電気泳動を行った。回収した neo 発現ユニットを含む約 1.7 kbp の DNA 断片を、予め Bam H I で切断後、T 4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化したプラスミド pBS246 (ギブコ B R L 社製) に対して T 4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pBS246neo を得た。このプラスミドを Not I で切断後、1 % アガロースゲル電気泳動を行い、loxP 配列に挟まれた neo 発現ユニットを持つ約 2 kbp の DNA 断片を回収した。この DNA 断片を、予め EagI で切断した pA と T 4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、neo 遺伝子の方向が PS-1 遺伝子と同方向になっているプラスミド pB を得た (図 6)。

プラスミド pB を BamH I および Sal I で切断後、1 % アガロースゲル電気泳動を行い、OS-2 型変異を持ち、かつ loxP 配列に挟まれた neo 発現ユニットを持つ DNA 断片 C を回収した。また、P $\alpha$  を Sal I および BamH I で切断して得た約 6.5 kbp の DNA 断片を pBluescript II KS+へサブクローニングして得たプラスミド pSB-2 を、Hind III および BamH I で切断後、1 % アガロースゲル電気泳動を行い、約 4 kbp の DNA 断片 D を回収した。DNA 断片 C および D を T 4 DNA リガーゼを用いて結合した後、Hind III および Sal I で切断し、DNA 断片 C と D が Bam H I 部位で結合した DNA 断片を得た。この DNA 断片を、予め Hind III および Sal I で切断した pBluescript II KS+ と T 4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換し、ターゲッティングベクター pOS-2neo<sub>loxP</sub> を得た (図 7)。

## 例7：ES細胞へのターゲッティングベクターの導入

以下の実施例で記載する細胞の培養は、全て 37°C の 5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中で行った。1.5 % FBS および 10<sup>3</sup> units/ml の LIF (ESGRO 社製) を添加

したDMEM培地（以下、ES用培地と略す）で維持しているES細胞R1に対して、エレクトロポレーション（electroporation）法によりターゲッティングベクターの導入を行った。エレクトロポレーションを実施する前日に新鮮なES用培地と交換したR1細胞を集め、エレクトロポレーション用溶液（20 mM HEPES, pH 7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6mM dextrose）で洗浄した。10<sup>7</sup> 個のR1細胞を、Not I で線状化した25  $\mu\text{g}$  のターゲッティングベクター pOS-2neoloxP と 0.8 ml のエレクトロポレーション用溶液を用い、エレクトロポレーション用キュベット中で混合した。1～2分後、Bio-Rad GenePulser（バイオラッド社製）を使用してパルスを与えた（パルス条件：240V, 500  $\mu\text{F}$ ）。遠心分離によりES細胞を回収し、30 ml のES用培地に懸濁した。予め8 ml のES用培地中にフィーダー細胞を播いてある10 ml ディッシュ1枚当たりこのES細胞懸濁液2 ml を加え、12～18時間後に力価150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のG418を添加して、1週間培養した。なお、フィーダー細胞としては、本発明者がHS1ノックアウトマウス（I. Taniuchi 等；EMBO J. 14 巻、3664 頁、1995 年）の雄と野性型のICR系統の雌を交配し、12～13日胚から分離して樹立した線維芽細胞を使用した。

#### 例8：相同組換えを起こしたES細胞の取得

例7において、G418の添加後1週間培養して生じてきたES細胞のコロニーを採取した。各コロニーを二分し、一つは培養を継続した。もう一つは相同組換えを起こしているクローンを選択するためPBSで洗浄し、Proteinase K 処理を行った後、染色体DNAを回収してPCRによりクローンを選択した。PCRにおいて用いた合成プライマーの塩基配列は次の通りである。

Prsn1-2 : 5'-CCCAACTCTATTTCTACCCTCGTTCATCTG-3'

（構築したターゲッティングベクターの外側に有る塩基配列）

PKG-1 : 5'-TAGTGAGACGTGCTACTTCCATTTGTCACG-3'

（neo 発現ユニット中の塩基配列）



P C R の実験条件は、93℃で 30 秒、60℃で 1 分、68℃で 3 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、P C R 産物の 1 %アガロースゲル電気泳動を行い、予想される位置にバンドを生じたクローンを陽性と判断した。ここで陽性と判断されたクローンはオリゴデオキシヌクレオチド PRL-101 および PRL-102 を用いた P C Rを行い、P C R 産物を Sau3AI で切断した後、2%アガロースゲル電気泳動を行い、バンドが二分されていることから変異が導入されていることを確認して正しく相同組換えを起こした E S 細胞を選択した。

PRL-101 および PRL-102 の塩基配列は次の通りである。

PRL-101 : 5'-TGCTGGAGGAAAATGTGTTATTTAAGAGCA-3'

PRL-102 : 5'-TACTGAAATCACAGCCAAGATGAGCCATGC-3'

#### 例 9 : ノックインマウスの取得 :

相同組換えを起こしていることが確認された E S 細胞の培養を 4 日間継続した後、細胞をトリプシン処理によりバラバラに分散した。マウス BDF1 系統の雄を掛け合わせた同系統の雌より 8 細胞期胚を取り出し、透明帯を外した後、バラバラにした上記 E S 細胞を接着させた (20 E S 細胞 / 8 細胞期胚 1 個)。これを偽妊娠処理した雌マウスの子宮に移し、胎児の発生を継続させることによりキメラマウスを得た。このキメラマウスの雄を C57BL/6 の雌と交配し、生まれた仔のうちアグチ色のものを選び、その尾の一部を切断した試料から染色体 DNA を抽出した。PRL-101 および PRL-102 を用いて P C Rを行った後、Sau3AI で P C R 産物を切断し、2%アガロースゲル電気泳動を行い、切断されたバンドの存在を調べることにより O S - 2 型変異を持っていることを確認した。確認されたマウスのうち雄を一匹選び # 2 とした。

#### 例 10

例 9 で得られた ノックインマウス # 2 はターゲッティングベクター由来の loxP で挟まれた neo 発現ユニットをヘテロの状態で有している。このマウス #

2 (雄性、約 4 ケ月齢) を CAG-cre#13 (K. Sakai 等: Biochem. Biophys. Res. Commun. 217:318, 1997) トランスジェニックマウスの F4 の雌 (2 ケ月齢: 導入した cre 遺伝子はヘテロの状態となっている。) と交配し、例 8 で述べた条件でオリゴデオキシヌクロチド PRL-100, PRL-102 及び PGK-1 を用いて PCR を行い、neo 発現ユニットが除かれたマウスを選択することにより、neo 発現ユニットを持たない OS-2 型変異のノックインマウスを取得した (図 8)。本マウスは OS-2 型変異に関してヘテロであり、また、一つの loxP を保持している。なお、PCR に使用した PRL-100、PRL-102 及び PGK-1 の塩基配列は以下のとおりである。

PRL-100: 5'-GGT CCA TCC CAG CTT CAC ACA GAC AAG TCT-3'

PRL-102: 5'-TAC TGA AAT CAC AGC CAA GAT GAG CCA TGC-3'

PGK-1: 5'-TAG TGA GAC GTG CTA CTT CCA TTT GTC ACG-3'

#### 産業上の利用可能性

本発明の遺伝子変異動物は、変異プレセリニン-1 遺伝子を有するために、正常動物 (その変異を持たない動物) に比較してアミロイド  $\beta$  の生産量が多く、大脑海馬神経細胞死や脱落が早期に起こりアルツハイマー症状を呈する。従って、本発明の遺伝子変異動物を用いて、アルツハイマー病の予防及び/又は治療に有用な物質のスクリーニングなどを行うことができ、有用性の評価を行うことができる。

## 請求の範囲

1. 変異プレセニリン遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。  
2. プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有する請求の範囲第1項記載の遺伝子変異動物。

3. プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、次の番号：

第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第231番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番からなる群から選ばれる1又は2以上の箇所のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する変異プレセニリン-1 蛋白をコードするDNA配列を含むプレセニリン-1 変異遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

4. プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、

A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436S、

(各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1 蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。)

からなる群から選ばれる1又は2以上の変異を有する変異プレセニリン-1 蛋白

をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

5. プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

6. プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA塩基配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

7. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

8. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

9. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、XYZはイソロイシン以外のアミノ酸をコードする3塩基のコドンを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコ

ードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1 遺伝子を有する請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

10. プレセニリン-2 蛋白のアミノ酸配列において、第141番及び/又は436番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

11. プレセニリン-2 蛋白のアミノ酸配列において、N141I及び/又はM239V(各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-2 蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。)の変異を有する変異プレセニリン-2 蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2 遺伝子を有する請求の範囲第10項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

12. アミロイドβ蛋白の過剰発現が変異プレセニリン-1 遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2 遺伝子に起因するものである、請求の範囲第1項ないし第11項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物。

13. 変異プレセニリン蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が、哺乳類動物の脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ蛋白を生産させるものである、請求の範囲第1項ないし第12項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

14. 遺伝子変異動物が哺乳類動物の齧歯類である請求の範囲第1項ないし第13項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

15. 遺伝子変異動物がマウスである請求の範囲第1項ないし第14項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

16. 変異プレセニリン-1 遺伝子及び/又は変異プレセニリン-2 遺伝子が相同組換えにより導入された請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

17. 変異プレセニリン-1 遺伝子により引き起こされた脳組織でのアミロイド蛋白の発現量が、正常動物と比較して記憶学習試験において障害された行動を引

き起こし、かつ当該動物の脳の海馬の脳皮質周辺部において異常な神経病理を誘発するのに十分であることを特徴とする、請求の範囲第1項ないし第16項のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

18. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の1又は2以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子とマーカー蛋白をコードする塩基配列とを含むDNA配列を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

19. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはA、G、又はCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)である変異プレセニリン-1遺伝子のDNA配列又はその部分配列を含むプラスミド。

20. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子であって、第213番のアミノ酸の付近をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)である遺伝子のDNA配列又はその部分配列を含むプラスミド

21. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のエクソン8を含む染色体DNA。

22. プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のcDNA又は染色体DNAの全長又は変異部分を含む塩

基配列に対して Sau3AI 部位が導入されたDNAを含むプラスミド。

23. アミノ酸の置換が213番のイソロイシンからスレオニンへの置換である請求の範囲第22項に記載のプラスミド。

24. 下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAMCGCCACCCACTGGAAAGGCCCC-3'

(ここでMはT又はCを意味する。)

で特定されるDNAを含むプラスミド。

25. マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセリニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む遺伝子。

26. アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である請求の範囲第25項に記載の遺伝子。

27. (1) マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセリニリン-1蛋白をコードする遺伝子、及び(2) loxP では含まれたネオマイシン発現ユニットを含むプラスミド。

28. アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である請求の範囲第27項に記載のプラスミド。

29. 下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCCC-3'

(ここでMはT又はCを意味する。)

で特定されるDNAを含むプラスミドが導入されたことを特徴とする胚。

30. 請求の範囲第20項、第22項、第23項、第24項、第27項、又は第28項に記載のプラスミドを用いた相同組換えにより得られた胚。

31. 胚が哺乳類動物の齧歯類由来の胚である請求の範囲第29項又は第30項に記載の胚。

32. マウス由来の胚性幹細胞である請求の範囲第29項ないし第31項のいずれ

か1項に記載の胚。

33. 請求の範囲第1項ないし第18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物の細胞を単離し、組織培養により培養することにより得られる初代培養細胞又は継代培養細胞。

34. 変異プレセニリン-1蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が脳の海馬又は大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイド $\beta$ 蛋白を生産させることができる変異プレセニリン-1遺伝子を相同組換え法により動物の胚に導入する工程を含む、ヒト以外の遺伝子変異動物の作製方法。

35. 請求の範囲第34項に記載の遺伝子変異動物の作製方法において、第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に変異した変異プレセニリン-1変異蛋白を発現する方法。

36. 被検物質を投与した請求の範囲第1項ないし第18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と無投与又は対照物質を投与した該動物との比較を行う工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質の評価方法。

37. 記憶学習試験により比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

38. 病理試験により比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

39. 大脳皮質周辺部での神経病理に基づく病理試験により比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

40. 神経病理に基づく病理試験による比較が、当該脳の大脳皮質周辺部での肥大したグリオシスの減少の抑制、当該脳の大脳皮質周辺部での2-デオキシグルコース取り込みの減少の抑制、及び当該脳の大脳皮質での2-デオキシグルコース利用の減少の抑制からなる群から選択される1又は2以上の項目の比較である、請求の範囲第38項又は第39項に記載の評価方法。

41. 当該動物の生存期間、探索行動、及び移動行動からなる群から選ばれる1又は2以上の項目について比較を行う請求の範囲第36項に記載の評価方法。

42. 請求の範囲第33項に記載の初代培養細胞又は継代培養細胞を被検化合物



の存在下でイン・ビトロ細胞培養する工程を含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防剤の評価方法。

43. OS-2型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子の部分塩基配列を用いることを特徴とする、アルツハイマー病又はアルツハイマー病の発症可能性の診断方法。

44. 請求の範囲第36項ないし第42項のいずれか1項に記載の評価方法により選択されたアルツハイマー病の治療及び/又は予防に有用な物質。

45. 請求の範囲第44項に記載の物質を有効成分として含むアルツハイマー病の治療剤及び/又は予防剤。

46. 請求の範囲第1項ないし第18項に記載の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多い動物とを掛け合わせるにより作製したハイブリッド動物およびその子孫であって変異プレセニリン遺伝子とアミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有する遺伝子変異動物。

47. 動物がマウスである請求の範囲第46項に記載の遺伝子変異動物。

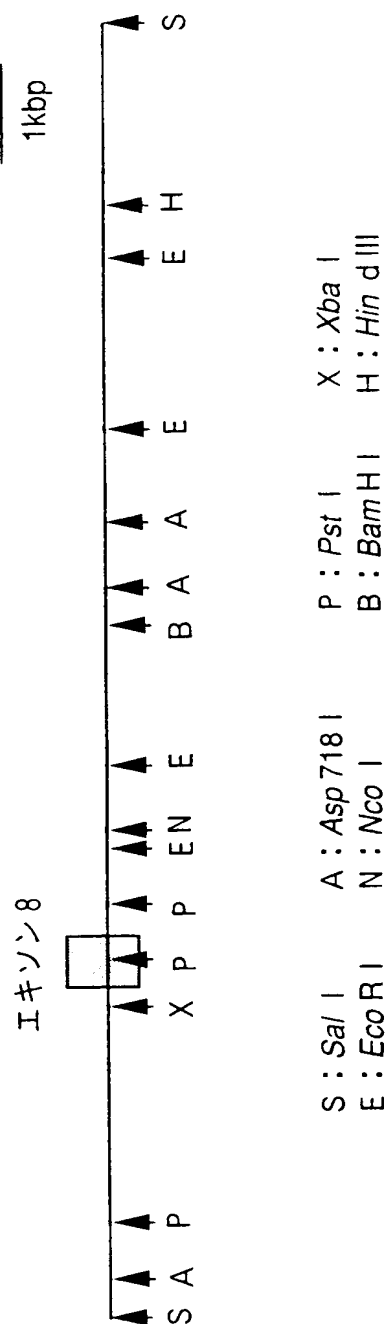
48. アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多いマウスが、PS1変異したマウスである請求の範囲第47項に記載の遺伝子変異動物。

49. 請求の範囲第7項ないし18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多いマウスとを掛け合わせるにより作製したハイブリッドマウスおよびその子孫であって変異プレセニリン遺伝子とアミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有する遺伝子変異マウス。

50. 請求の範囲第7項ないし18項のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と、アミロイド前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有しアミロイド $\beta$ タンパクの生産量の多いマウスとを掛け合わせるにより生まれたハイブリッドマウスおよびその子孫であって変異プレセニリン遺伝子とアミロイド

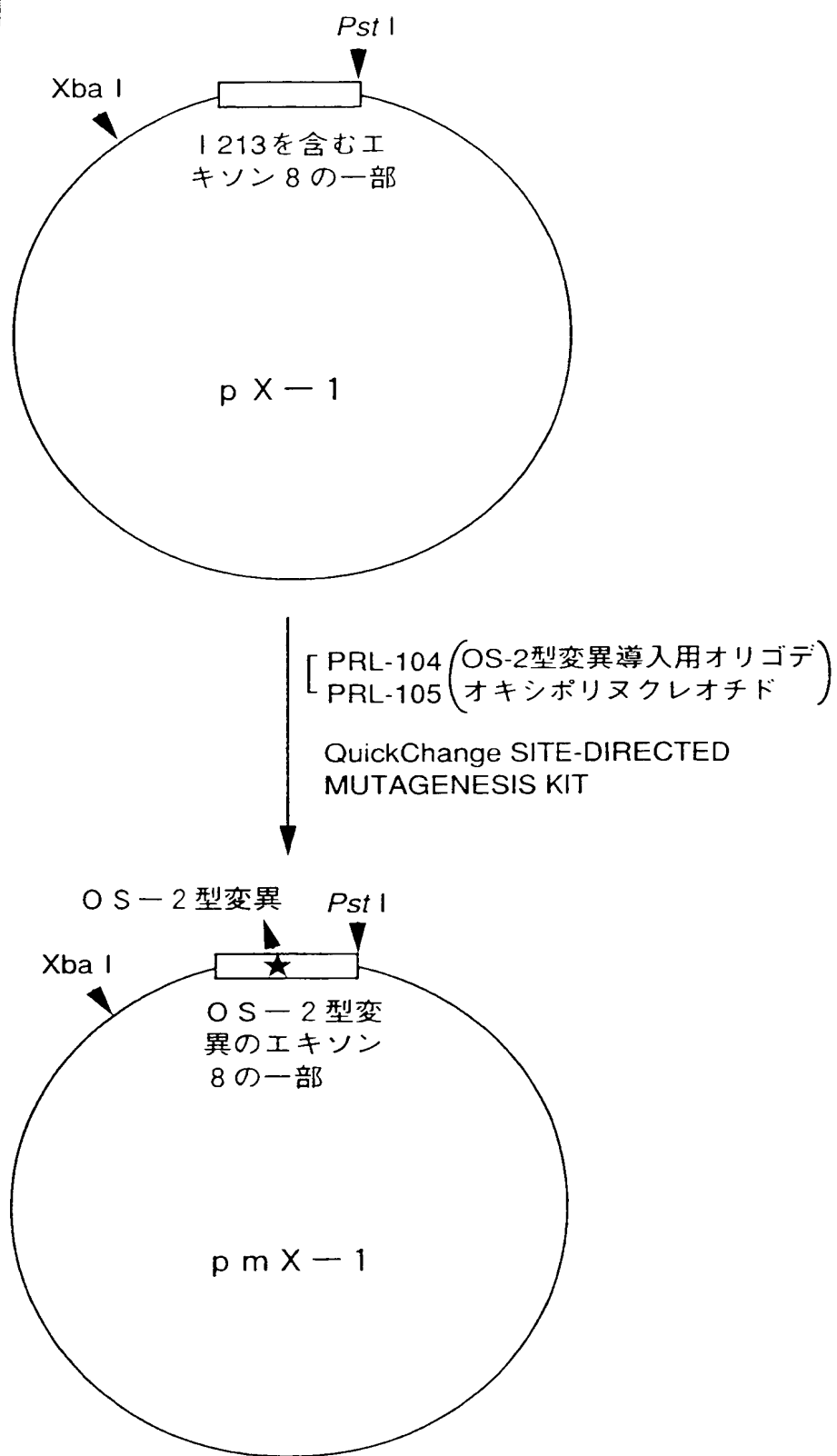
前駆体タンパクの変異蛋白をコードする遺伝子を有する遺伝子変異マウス。

第1図



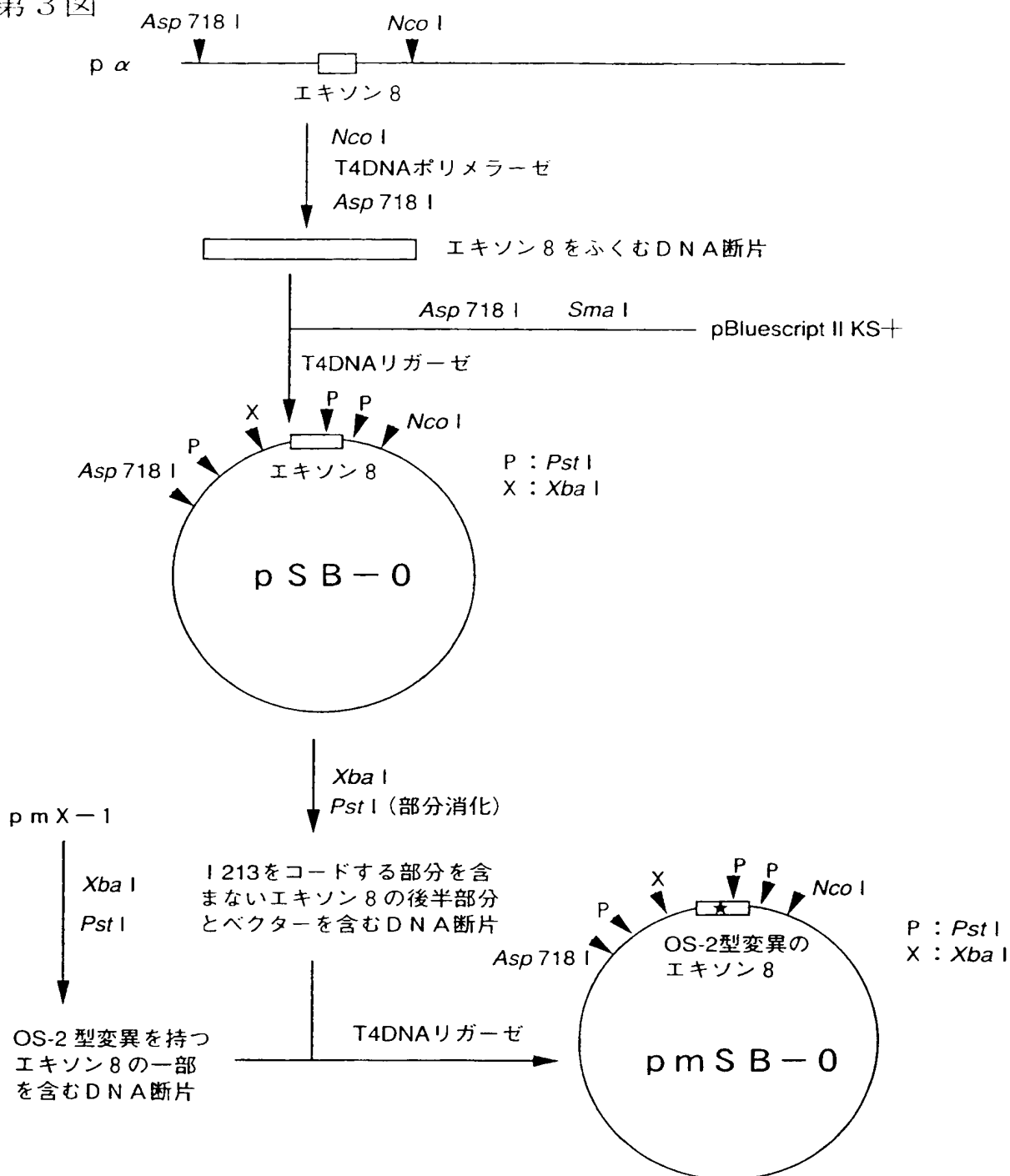


第2図





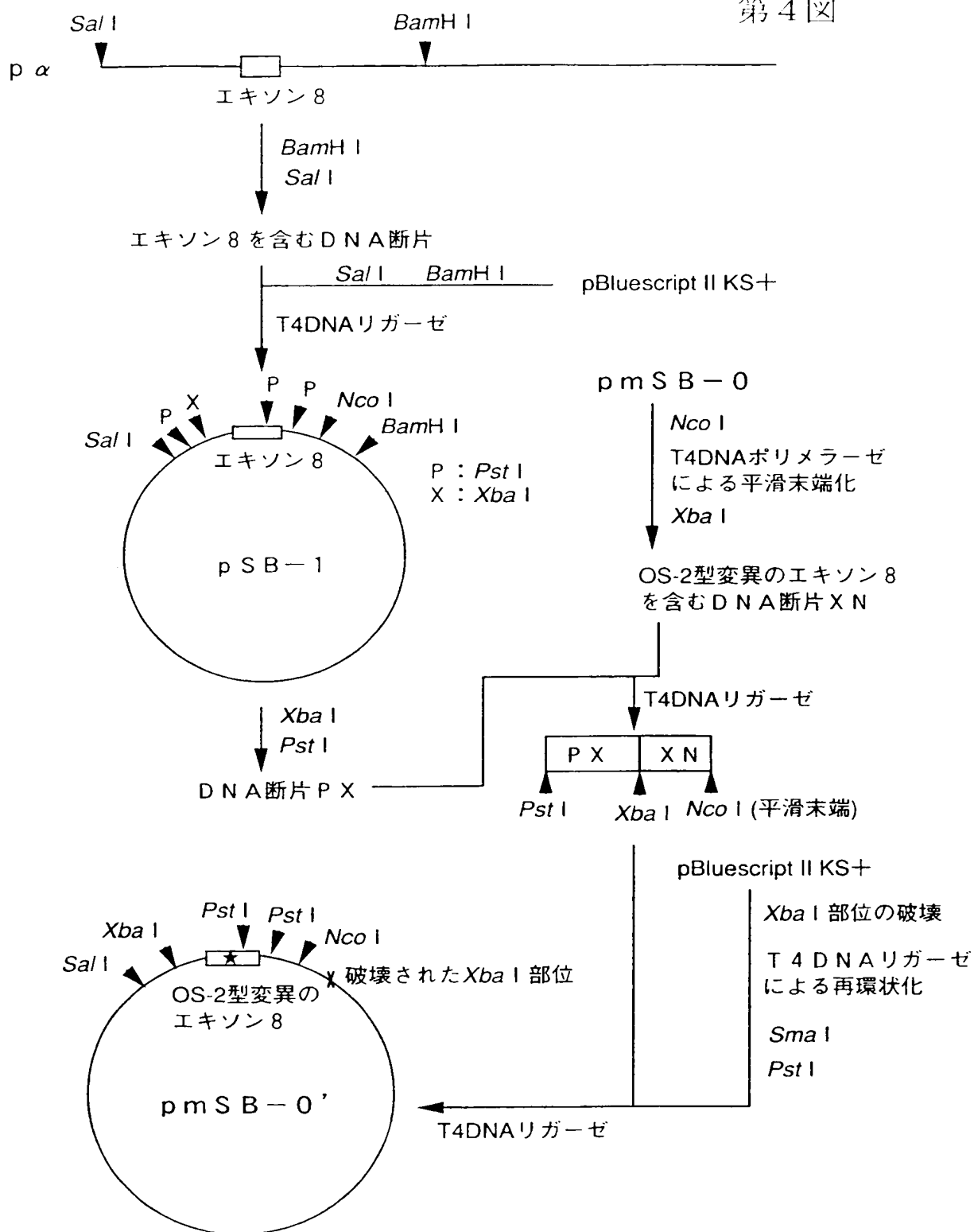
## 第3図





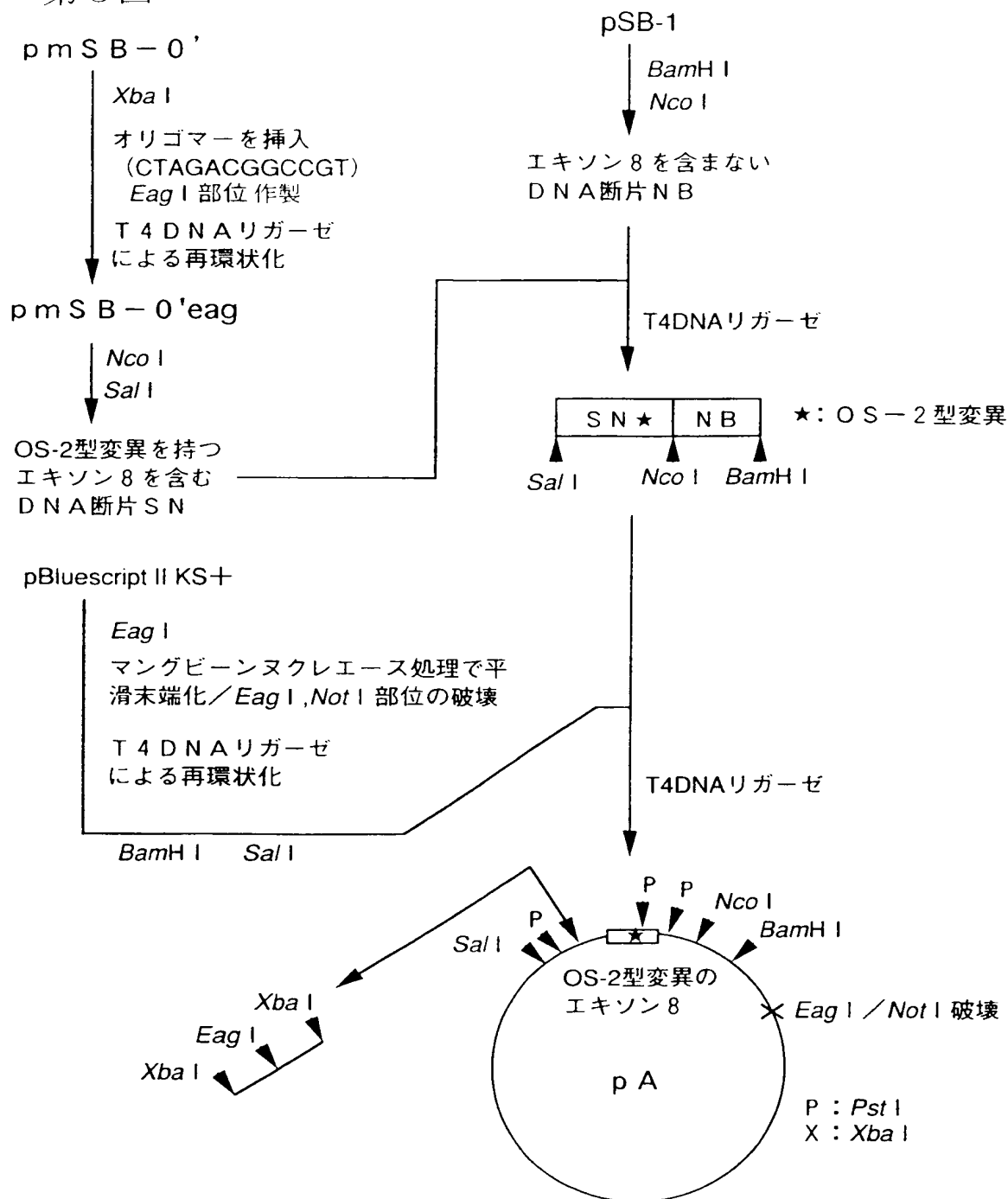


第4図



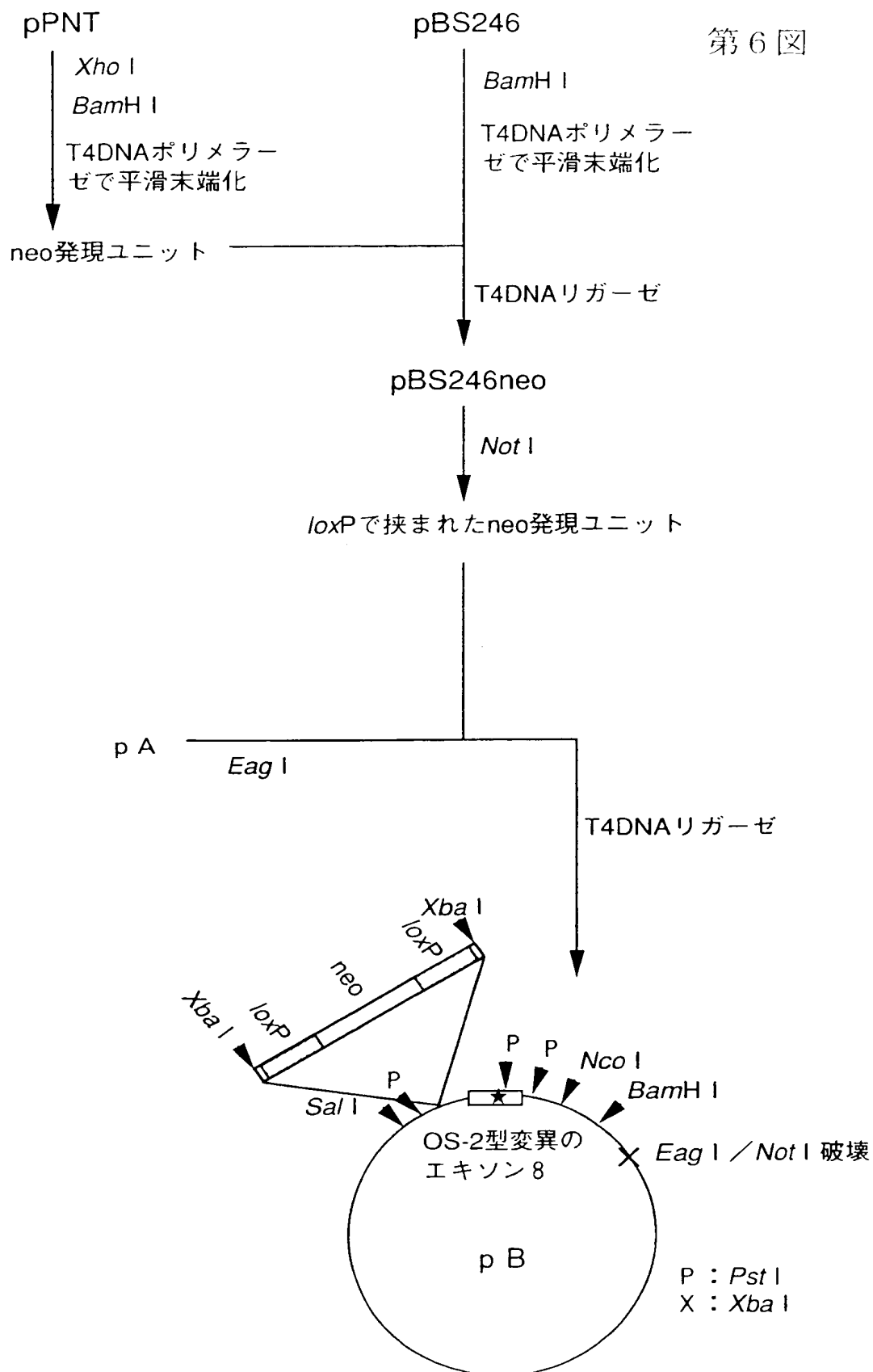


## 第5図



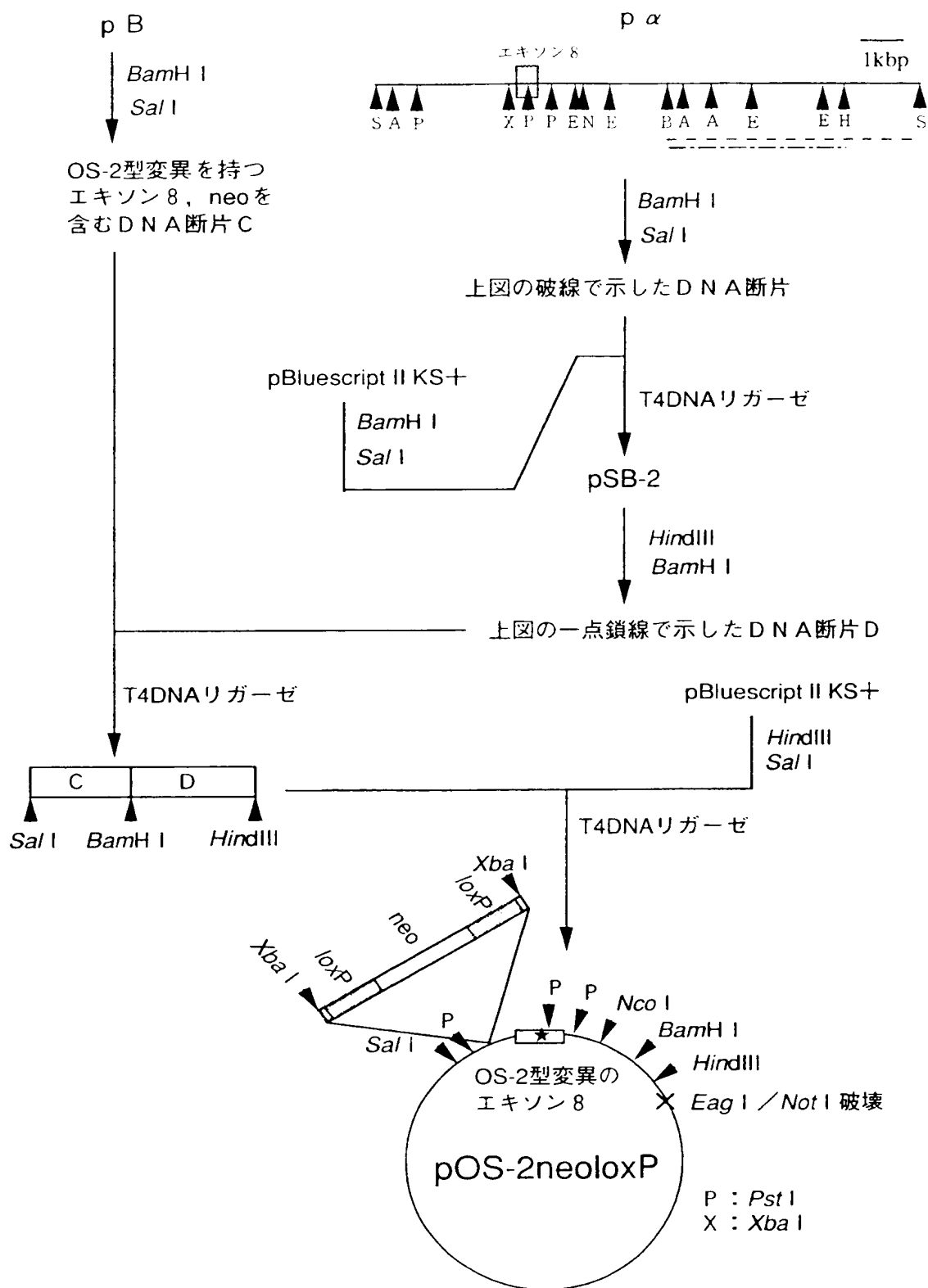


第6図





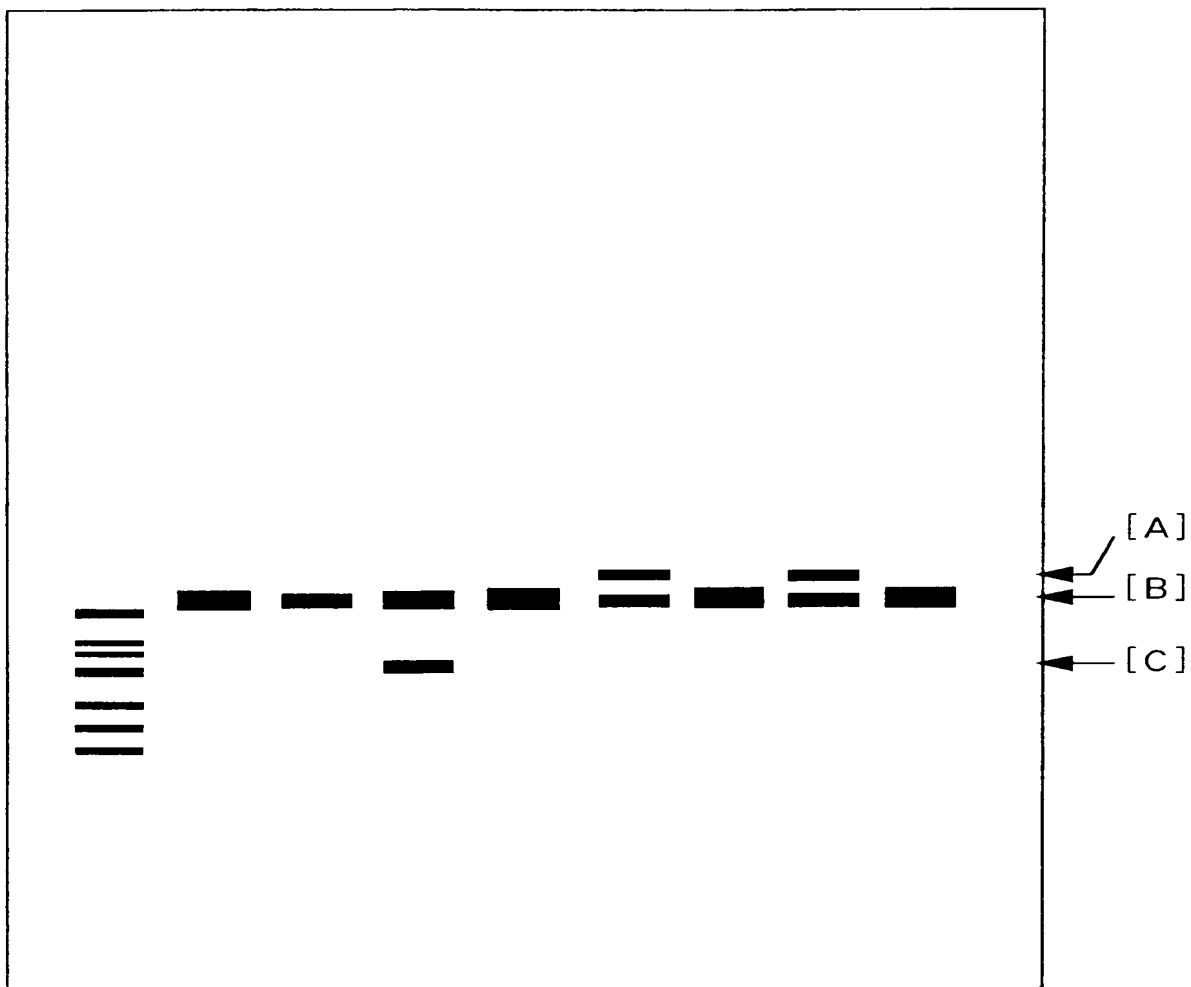
第7図







第 8 図





## SEQUENCE LISTING

110 Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

120 Mutant animals

130 98291M

150 JP P1998-002191

151 1998-01-08

160 17

210 1

211 467

212 PRT

213 Human

400 1

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln 15

Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn 30

Asp Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly 45

His Pro Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg 60

Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu 75

Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr 90

Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe 105

Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 120

Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn 135

Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Leu Leu 150

Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala Trp 165

Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile 180

Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr 195

Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met 210



Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr 225  
Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr 240  
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 255  
Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 270  
Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala 285  
Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu 300  
Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr 315  
Asn Ala Glu Ser Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu 330  
Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp 345  
Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala 360  
Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu 375  
Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser 390  
Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn 405  
Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu 420  
Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu 435  
Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp 450  
Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe 465  
Tyr Ile 467

(210) 2

(211) 1404

(212) DNA



(213) Human

(400) 2

atg aca gag tta cct gca ccg ttg tcc tac ttc cag aat gca cag 45  
atg tct gag gac aac cac ctg agc aat act gta cgt agc cag aat 90  
gac aat aga gaa cgg cag gag cac aac gac aga cgg agc ctt ggc 135  
cac cct gag cca tta tct aat gga cga ccc cag ggt aac tcc cgg 180  
cag gtg gtg gag caa gat gag gaa gaa gat gag gag ctg aca ttg 225  
aaa tat ggc gcc aag cat gtg atc atg ctc ttt gtc cct gtg act 270  
ctc tgc atg gtg gtg gtc gtg gct acc att aag tca gtc agc ttt 315  
tat acc cgg aag gat ggg cag cta atc tat acc cca ttc aca gaa 360  
gat acc gag act gtg ggc cag aga gcc ctg cac tca att ctg aat 405  
gct gcc atc atg atc agt gtc att gtt gtc atg act atc ctc ctg 450  
gtg gtt ctg tat aaa tac agg tgc tat aag gtc atc cat gcc tgg 495  
ctt att ata tca tct cta ttg ttg ctg ttc ttt ttt tca ttc att 540  
tac ttg ggg gaa gtg ttt aaa acc tat aac gtt gct gtg gac tac 585  
att act gtt gca ctc ctg atc tgg aat ttt ggt gtg gtg gga atg 630  
att tcc att cac tgg aaa ggt cca ctt cga ctc cag cag gca tat 675  
ctc att atg att agt gcc ctc atg gcc ctg gtg ttt atc aag tac 720  
ctc cct gaa tgg act ggc tgg ctc atc ttg gct gtg att tca gta 765  
tat gat tta gtg gct gtt ttg tgt ccg aaa ggt cca ctt cgt atg 810  
ctg gtt gaa aca gct cag gag aga aat gaa acg ctt ttt cca gct 855





ctc att tac tcc tca aca atg gtg tgg ttg gtg aat atg gca gaa 900  
 gga gac ceg gaa gct caa agg aga gta tcc aaa aat tcc aag tat 945  
 aat gca gaa agc aca gaa agg gag tca caa gac aet gtt gca gag 990  
 aat gat gat ggc ggg ttc agt gag gaa tgg gaa gcc cag agg gac 1035  
 agt cat cta ggg cct cat cgc tet aca cct gag tca cga gct gct 1080  
 gtc cag gaa ctt tcc agc agt atc ctc gct ggt gaa gac cca gag 1125  
 gaa agg gga gta aaa ctt gga ttg gga gat ttc att ttc tac agt 1170  
 gtt ctg gtt ggt aaa gcc tca gca aca gcc agt gga gac tgg aac 1215  
 aca acc ata gcc tgt ttc gta gcc ata tta att ggt ttg tgc ctt 1260  
 aca tta tta ctc ctt gcc att ttc aag aaa gca ttg cca gct ctt 1305  
 cca atc tcc atc acc ttt ggg ctt gtt ttc tac ttt gcc aca gat 1350  
 tat ctt gta cag cct ttt atg gac caa tta gca ttc cat caa ttt 1395  
 tat atc tag 1404

<210> 3

<211> 467

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 3

Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln 15

Met Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn 30

Asp Ser Gln Glu Arg Gln Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp 45

Asn Pro Glu Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg 60

Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu 75



Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr 90  
Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe 105  
Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 120  
Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn 135  
Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Leu 150  
Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala Trp 165  
Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile 180  
Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr 195  
Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met 210  
Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr 225  
Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr 240  
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 255  
Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 270  
Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala 285  
Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu 300  
Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr 315  
Asn Thr Gln Arg Ala Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly 330  
Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp 345  
Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala 360  
Val Gln Glu Leu Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu 375



Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser 390  
Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn 405  
Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu 420  
Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu 435  
Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp 450  
Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe 465  
Tyr Ile 467

<210> 4

<211> 1404

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

atg aca gag ata cct gca cct ttg tcc tac ttc cag aat gcc cag 45  
atg tct gag gac agc cac tcc agc agc gcc atc cgg agc cag aat 90  
gac agc caa gaa cgg cag cag cag cat gac agg cag aga ctt gac 135  
aac cct gag cca ata tct aat ggg cgg ccc cag agt aac tca aga 180  
cag gtg gtg gaa caa gat gag gag gaa gac gaa gag ctg aca ttg 225  
aaa tat gga gcc aag cat gtc atc atg ctc ttt gtc ccc gtg acc 270  
ctc tgc atg gtc gtc gtc gtg gcc acc atc aaa tca gtc agc ttc 315  
tat acc cgg aag gac ggt cag cta atc tac acc cca ttc aca gaa 360  
gac act gag act gta ggc caa aga gcc ctg cac tgc atc ctg aat 405  
gcg gcc atc atg atc agt gtc att gtc att atg acc atc ctc ctg 450



gtg gtc ctg tat aaa tac agg tgc tac aag gtc atc cac gcc tgg 495  
ctt att att tca tet ctg ttg ttg ctg ttc ttt ttt teg ttc att 540  
tac tta ggg gaa gta ttt aag acc tac aat gtc gcc gtg gac tac 585  
gtt aca gta gca ctc cta atc tgg aat ttt ggt gtg gtc ggg atg 630  
att gcc atc cac tgg aaa ggc ccc ctt cga ctg cag cag geg tat 675  
ctc att atg atc agt gcc ctc atg gcc ctg gta ttt atc aag tac 720  
ctc ccc gaa tgg acc gca tgg ctc atc ttg get gtg att tca gta 765  
tat gat ttg gtg get gtt tta tgt ccc aaa ggc cca ctt cgt atg 810  
ctg gtt gaa aca get cag gaa aga aat gag act ctc ttt cca get 855  
ctt atc tat tcc tca aca atg gtg tgg ttg gtg aat atg get gaa 900  
gga gac cca gaa gcc caa agg agg gta ccc aag aac ccc aag tat 945  
aac aca caa aga gcg gag aga gag aca cag gac agt ggt tet ggg 990  
aac gat gat ggt ggc ttc agt gag gag tgg gag gcc caa aga gac 1035  
agt cac ctg ggg cct cat cgc tcc act ccc gag tca aga get get 1080  
gtc cag gaa ctt tet ggg agc att cta acg agt gaa gac cgg gag 1125  
gaa aga gga gta aaa ctt gga ctg gga gat ttc att ttc tac agt 1170  
gtt ctg gtt ggt aag gcc tca gca acc gcc agt gga gac tgg aac 1215  
aca acc ata gcc tgc ttt gta gcc ata ctg atc ggc ctg tgc ctt 1260  
aca tta ctc ctg ctc gcc att ttc aag aaa geg ttg cca gcc ctc 1305  
ccc atc tcc atc acc ttc ggg ctc gtg ttc tac ttc gcc acg gat 1350





tac ctt gtg cag ccc ttc atg gac caa ctt gca ttc cat cag ttt 1395

tat atc tag 1404

210 5

211 25

212 DNA

213 Artificial Sequence

400 5

ggaattttgg tgtggtcggg atgat

210 6

211 23

212 DNA

213 Artificial Sequence

400 6

ggtcattcg gggaggtact tga

210 7

211 36

212 DNA

213 Artificial Sequence

400 7

tgtggtcggg atgatgccca cccactggaa aggcce

210 8

211 36

212 DNA

213 Artificial Sequence

400 8

gggccttcc agtgggtggc gatcatcccg accaca

210 9

211 18

212 DNA

213 Artificial Sequence

400 9

tctagacggc cgtctaga

210 10



211 18  
212 DNA  
213 Artificial Sequence  
400 10

agatctgccg gcagatct

210 11  
211 30  
212 DNA  
213 Artificial Sequence  
400 11

cccaactcta ttctaccct cgttcactctg

210 12  
211 30  
212 DNA  
213 Artificial Sequence  
400 12

tagtgagacg tgctacttcc atttgcacg

210 13  
211 30  
212 DNA  
213 Artificial Sequence  
400 13

tgctggagga aaatgtgtta ttttaagagca

210 14  
211 30  
212 DNA  
213 Artificial Sequence  
400 14

tactgaaatc acagccaaga tgagccatgc

210 15  
211 30  
212 DNA  
213 Artificial Sequence  
400 15

ggtcacccc agcttcacac agacaagtct



<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

tactgaaatc acagccaaga tgagccatgc

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

tagtgagacg tgctacttcc atttgtcacg



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00015

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. Duff et al., Nature, vol. 383, p.710-713 (1996)	1-4, 12-15, 17
Y		18, 33, 36-45
		5-11, 16,
		19-32, 34, 35
X	D.R. Borchelt et al., Neuron, vol. 17, p.1005-1013 (1996)	1-4, 12-15, 17
Y		18, 33, 36-45
		5-11, 16,
		19-32, 34, 35
X	M. Citron et al., Nature Medicine, vol. 3(1), p.67-72 (1997)	1-4, 12-15, 17
Y		18, 33, 36-50
		5-11, 16,
		19-32, 34, 35
Y	J. Hardy et al., TINS, vol. 20(4), p.154-159 (1997)	1-50
Y	K. Kamino et al., Neuroscience Letters, vol.208, p.195-198 (1996)	1-50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
25 March, 1999 (25. 03. 99)

Date of mailing of the international search report  
6 April, 1999 (06. 04. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00015

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ken'ichi Yamamura, "Byoutai seiri", vol. 14(12), p.961-966 (1995)	16, 30, 34
Y	U.A.K. Betz et al., vol. 6(10), p.1307-1316 (1996)	27, 28



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ° A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ° A01K67/027, A61K45/00, C12N15/12, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	K. Duff et al., Nature, vol. 383, p. 710-713 (1996)	1-4, 12-15, 17 18, 33, 36-45 5-11, 16, 19-32, 34, 35
X Y	D. R. Borchelt et al., Neuron, vol. 17, p. 1005-1013 (1996)	1-4, 12-15, 17 18, 33, 36-45 5-11, 16, 19-32, 34, 35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.03.99

国際調査報告の発送日

06.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子

2 B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 6944

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	M.Citron et al., Nature Medicine, vol.3(1), p.67-72 (1997)	1-4, 12-15, 17
Y		18, 33, 36-50
Y	J.Hardy et al., TINS, vol.20(4), p.154-159 (1997)	5-11, 16, 19-32, 34, 35
Y	K.Kamino et al., Neuroscience Letters, vol.208, p.195-198 (1996)	1-50
Y	山村研一, 「病態生理」, vol.14(12), p.961-966 (1995)	1-50
Y	U.A.K.Betz et al., vol.6(10), p.1307-1316 (1996)	16, 30, 34
		27, 28